

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marcio Maciel Cascante Rusenhack

**EFEITO DE UM PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO
NA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINAS E
CITOCINAS CIRCULANTES EM CONDIÇÕES DE
STRESSE TÉRMICO**

**Tese no âmbito do Doutoramento em Ciências do Desporto, Ramo de
Actividade Física e Saúde, orientada pela Professora Doutora Ana Maria
Miranda Botelho Teixeira e pelos Professores Doutores Amândio Manuel
Cupido Santos e José Moncada Jiménez e apresentada à Faculdade de
Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra.**

Junho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marcio Maciel Cascante Rusenhack

**EFEITO DE UM PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO
NA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINAS E
CITOCINAS CIRCULANTES EM CONDIÇÕES DE
STRESSE TÉRMICO**

**Tese no âmbito do Doutoramento em Ciências do Desporto, Ramo de
Actividade Física e Saúde, orientada pela Professora Doutora Ana Maria
Miranda Botelho Teixeira e pelos Professores Doutores Amândio Manuel
Cupido Santos e José Moncada Jiménez e apresentada à Faculdade de
Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra.**

Junho de 2022

EFEITO DE UM PROTOCOLO DE ACLIMATAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE ENDOTOXINAS E CITOCINAS CIRCULANTES EM CONDIÇÕES DE STRESSE TÉRMICO

Marcio Maciel Cascante Rusenhack

**Tese no âmbito do Doutoramento em Ciências do Desporto, Ramo de
Actividade Física e Saúde, orientada pela Professora Doutora Ana Maria
Miranda Botelho Teixeira e pelos Professores Doutores Amândio Manuel
Cupido Santos e José Moncada Jiménez e apresentada à Faculdade de
Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra.**

Junho de 2022



**UNIVERSIDADE D
COIMBRA**

Esta tese foi desenvolvida com apoio financeiro da:



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

OAICE

Oficina de
Asuntos Internacionales
y Cooperación Externa



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA
Sede del Atlántico

Bolsa de doutoramento atribuída a Marcio Maciel Cascante Rusenhack:

Contrato: OAICE-129-2018

1 2



9 0

FACULDADE DE
CIÊNCIAS DO DESPORTO
E EDUCAÇÃO FÍSICA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu grande guia, minha esperança e minha força, pelo dom da vida, pela saúde e por esta oportunidade. Porque, em sua infinita sabedoria, nos permite vivenciar situações, com um objetivo que muitas vezes não conhecemos, mas que é sempre para o nosso bem.

À Universidade da Costa Rica, pela bolsa de estudos, pois com essa ajuda foi possível realizar algo que começou como um sonho. Aos membros da Assembleia da Sede Atlântica, pelos seus votos e confiança. À OAICE e a todas as pessoas envolvidas.

À minha família, ao meu pai (até o céu) e a minha mãe, quem até hoje está sempre ao meu lado, independente da hora ou do motivo. A ambos, pelo apoio e amor incondicional, por serem um exemplo de vida, por me educarem e pelos seus conselhos e orações. Aos meus irmãos, pelo apoio, em especial a Luiger, por estar sempre atenta e por suas motivações. Ao meu avô e meus sobrinhos, que também são uma motivação para terminar este trabalho.

Agradeço muito aos meus orientadores pelo tempo, dedicação, apoio e pelos conhecimentos partilhados durante este tempo todo. À Doutora Teixeira, ao Doutor Moncada e ao Doutor Amândio. São os três, excelentes pessoas.

Ao professor, doutor José Moncada, um especial agradecimento. Desde que o conheci tem me aconselhado a tentar dar o meu melhor em todos os momentos e a sempre fazer as coisas corretamente. Mais do que um professor, considero-o um amigo e um exemplo a seguir como profissional e como pessoa.

À professora, Doutora Rosibel Orozco, porque quando foi necessário me corrigiu ou justificou, conforme necessário, com o único objetivo de que melhorasse. E estava sempre ciente de que as coisas andassem no caminho certo.

Aos fiadores desta bolsa, pela confiança e por me terem dado o seu apoio, o mesmo que me permitiu estar onde estou agora. Grato por sempre.

À família Hall-Ochoa, são amigos incríveis, por seus conselhos e apoio. A Sahira Murga, que, sem o saber, nos seus pedidos de ajuda, me lembrou alguns dos motivos pelos quais decidi iniciar este processo. À senhora Isabel das Neves pela amizade, ajuda e apoio durante todo o tempo em Portugal.

Ao Carlos Farinha, Fernanda Silva, Catarina Santos e Carlos Soares, por ficarem sempre pendentes de mim, por sua amizade sem interesse, pelos conselhos, ajuda e motivação e por partilhar o seu tempo e conhecimento comigo. Também aos demais companheiros e amigos do doutoramento, a Meiry, Larissa, Lilian, Liliana e Rafael, pelos conselhos e ajuda. A todos vos desejo o melhor da vida tanto profissional como pessoal.

Aos atletas que participaram neste estudo, aos enfermeiros, o senhor Francisco Ferreira e a senhora Lilian Merini, que fizeram um trabalho incrível para recolher as amostras de todos os participantes do projeto. Ao professor doutor Luis Rama e a doutora Fátima Rosado pela ajuda no uso do laboratório. Ao ADAI, por permitir o uso do laboratório para o desenvolvimento da parte prática do projeto.

A todos que fizeram parte deste doutoramento, desta fase na minha vida. Foram incontáveis as contribuições e o apoio de tantas pessoas que tornaram possível terminar este trabalho. Sinceramente, muito grato com todos. Farão parte da minha vida sempre.

A finalização deste trabalho é a concretização de um objetivo profissional, a realização de um grande sonho, que ultrapassa a obtenção de um título. Grato por sempre.

*SON MUCHAS LAS MANOS Y LOS
CORAZONES QUE CONTRIBUYERON
AL ÉXITO DE UNA PERSONA*

AUTOR: WALT DISNEY

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	19
RESUMEN	20
ABSTRACT	21
CAPITULO I.....	23
INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	30
CAPITULO II	32
ESTADO DA ARTE / REVISÃO DE LITERATURA.....	32
2.1 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO CORPO HUMANO PARA ACLIMATAÇÃO AO CALOR	34
2.1.1. FATORES QUE AFETAM A ACLIMATAÇÃO AO CALOR DOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS.....	40
2.2. ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO	41
2.2.1 EXERCÍCIO AGUDO E FUNÇÃO IMUNE	45
2.2.2 EXERCÍCIO CRÓNICO E FUNÇÃO IMUNE.....	53
2.2.3. EXERCÍCIO EM CONDIÇÕES DE STRESSE TÉRMIC: RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS	57
METODOLOGIA.....	82
3.1. PARTICIPANTES	84
3.2. CRITERIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	85
3.3. DESENHO DO ESTUDO	86
3.3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	87

3.3.2. AVALIAÇÕES PRELIMINARES	89
3.3.3. COLHEITA DE SANGUE	91
3.3.4. COLHEITA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SALIVA.....	92
3.3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS E ENDOTOXINA....	93
3.3.6. WBGT (WET BULB GLOBE TEMPERATURE).....	93
3.4. INTERVENÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO	94
3.4.1. PROTOCOLO DETALHADO DO TESTE EXPERIMENTAL DE CORRIDA ATÉ A EXAUSTÃO	94
3.5. INTERVENÇÃO CLIMÁTICA (TESTE MÁXIMO REALIZADO SOBRE STRESS CLIMÁTICO).....	95
3.6. ACLIMATAÇÃO	96
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	97
CAPITULO IV	100
RESULTADOS.....	100
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES	102
4.2 AMBIENTE CLIMÁTICO NO LABORATÓRIO	103
4.3 RESULTADOS DAS VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS.....	104
4.5 RESULTADOS DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	111
4.6 RESULTADOS DA TEMPERATURA CORPORAL	119
4.7 RESULTADOS DO ESTADO DE HIDRATAÇÃO	119
CAPITULO V.....	121
DISCUSSÃO	121
CAPITULO VI	136
CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS.....	136
6.1 CONCLUSÕES.....	138
6.2 SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS	139
CAPITULO VII.....	141
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
CAPITULO VIII.....	157

ANEXOS 157

ANEXO I ¡Error! Marcador no definido.

ANEXO II..... ¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos de 14 dias de protocolos de exercícios passivos e vigorosos em ambientes quentes e frios em respostas fisiológicas selecionadas.	37
Tabela 2. Efeitos do exercício intenso sobre o sistema imunitario.	47
Tabela 3. Características dos participantes.	103
Tabela 4. Características do ambiente dentro do laboratório durante as provas e medições.	104
Tabela 5. Resultados das variáveis de desempenho físico e fisiológicas de acordo ao momento de avaliação e a intensidade de corrida.	107
Tabela 6. Resultados do efeito da intervenção do exercício nos indicadores bioquímicos, imunitários e endotóxicos obtidos nos momentos experimentais.....	113
Tabela 7. Temperatura corporal dos atletas no momentos de medição (n = 8).	119
Tabela 8. Estado de hidratação dos atletas nas provas experimentais (n = 8).	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo em forma de J da relação entre o risco de ITRS e o volume de exercício. Adaptado de Nieman (1994).....	44
Figura 2. Teoria da “Janela aberta”. Adaptada de (Brolinson & Elliott, 2007).	45
Figura 3. Hipotesis da “Janela aberta”. Adaptado de Simpson et al. (2015).....	54
Figura 4. Mecanismos potenciais que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios do exercício. Adaptado de Gleeson. et al. (2011).....	56
Figura 5. Vias de sinalização de células ativadas por TNF. Adaptada de (Kalliolias & Ivashkiv, 2016)	63
Figura 6. Sinalização do recetor da IL-6 (Adaptado de Hunter and Jones (2015)).....	65
Figura 7. Propriedades pro e anti-inflamatórias da IL-6 (Adaptado de Scheller et al. (2011)).....	67
Figura 8. Ativação e sinalização do recetor da IL-1 (Adaptado de Schett, Dayer, and Manger (2016)).....	68
Figura 9. Expressão da IL-10 no Sistema Imunitário (Adaptado de Saraiva and O'garra (2010)).....	70
Figura 10. Protocolo experimental.	88
Figura 11. Desenho experimental segundo o formato de Campbell e Stanley (Campbell. & Stanley, 1970).....	88
Figura 12. Efeito da aclimação no consumo máximo de oxigénio.....	108
Figura 13. Efeito da aclimação no dispêndio energético total.....	108
Figura 14. Efeito da aclimação na percepção do esforço.	109

Figura 15. Efeito da aclimação na Velocidade, FC, PAS, PAD, PAM e Consumo Energético, como resposta a intervenção do exercício nos diferentes momentos de avaliação.....	110
Figura 16. Δ nas concentrações de IL-6 após o exercício para cada momento de medição.....	114
Figura 17. Δ nas concentrações de IL-15 após o exercício para cada momento de medição.....	114
Figura 18. Δ nas concentrações de IL-10 após o exercício para cada momento de medição.....	115
Figura 19. Δ nas concentrações de TNF- α após o exercício para cada momento de medição.....	115
Figura 20. Δ nas concentrações de IL-1 β após o exercício para cada momento de medição.....	116
Figura 21. Δ nas concentrações de IL-1ra após o exercício para cada momento de medição.....	116
Figura 22. Δ nas concentrações de sCD14 após o exercício para cada momento de medição.....	117
Figura 23. Δ nas concentrações de Testosterona após o exercício para cada momento de medição.....	117
Figura 24. Δ nas concentrações de Cortisol, os rácios T/C, TNF- α /IL-10 e IL-1 β /IL-1ra, após o exercício para cada momento de medição.....	118

ABREVIATURAS

A

A – aldosterona
ADN – ácido desoxirribonucleico
ANOVA – análise de variância
AVP – arginina vasopressina

B

Bpm – batimentos por minuto

C

CO₂ – dióxido de carbono
COI – comitê olímpico internacional

D

DCs – células dendríticas

E

ERK – extracelular

F

FC – Frequência cardíaca

H

H – condições ambientais de stresse por calor
HA – aclimação ao calor
Hb – hemoglobina
HC – condições ambientais de stresse por calor com aclimação
Hct – hematócrito
HLA – antígeno leucocitário humano
HPA – hipotálamo-hipófise-adrenal
HS – condições ambientais de stresse por calor sem aclimação

I

IFN – interferão
Ig – imunoglobulina
IL – interleucina

IL-1ra – recetor antagonista de IL-1
ITRS – infeções do trato respiratório superior

J

JNK - c-Jun quinase N-terminal

L

LA – lactato
LAC_{máx} – concentração máxima de lactato
LBP – proteína de ligação aos lipopolissacarídeos do plasma
LPS – lipopolissacárido

M

MAPKs – proteínas quinases ativadas por mitógenos
mCD14 – membrana CD14
MHC – complexo de histocompatibilidade principal
Mo's – monócitos sanguíneos humanos

N

N – condições ambientais clássicas de climatério de laboratório
N₂ – nitrogénio
NaCl – cloreto de sódio
NC – condições ambientais clássicas de climatério de laboratório com aclimação ao calor
NFKB – intensificador de ator nuclear de cadeias leves kappa de células B ativadas
NK – natural killer
NS – condições ambientais clássicas de climatério de laboratório sem aclimação ao calor

O

O₂ – oxigénio

P

PAS – tensão arterial sistólica
PAD – tensão arterial diastólica
PAM – tensão arterial média
PBMCs – células mononucleares do sangue periférico
PCR – proteína C-reativa
PR – Renina plasmática

Q

QR – quociente respiratório

R

RER – intercâmbio oxigénio/CO₂
ROS – espécies reativas de oxigénio
RPE – esforço percebido

S

SAM - eixo medular simpatoadrenal
sCD14 – CD14 solúvel
sIL6-R – receptor de IL-6 solúvel
SNS – sistema nervoso simpático

T

T_c – temperatura central
TC – temperatura corporal
TE – tensão arterial
TGF – fator de transformação do crescimento
TLR – receptores de tipo Toll
TNF – fator de necrose tumoral
TNFR – receptores do fator de necrose tumoral
T_{regs} – células T reguladoras

V

V_{Pa} – Volume Plasmático antes
V_{Pb} – Volume Plasmático depois
VE – ventilação
VO₂_{máx} – consumo máximo de oxigénio
VP – volume plasmático

W

WBGT – temperatura do globo do bulbo Húmido

RESUMO

O objetivo principal deste estudo foi determinar o efeito do exercício em condições ambientais clássicas de laboratório, assim como em condições ambientais de stresse térmico (HS), nas respostas fisiológicas (FC, VO₂máx, VE, QR, Lactato, Tensão Arterial, Dispendio Energético, Consumo Energético, RPE, Cortisol e Testosterona), inflamatórias (IL-6, IL-15, IL-10, TNF- α , IL- β , IL-1ra), e endotóxicas (sCD14), em atletas, antes e depois de realizar um protocolo de aclimação ao calor (HA). As variáveis fisiológicas (à exceção do Cortisol e Testosterona), foram avaliadas em duas intensidades (moderada LAC = 2mmol/l e alta LAC = 4mmol/l). Também foram feitas medições de temperatura corporal (TC), e do estado de hidratação dos atletas. A amostra utilizada neste estudo foi composta por atletas de corrida de diferentes especialidades que competem a nível nacional em Portugal (n = 8; 37.5 \pm 11.21 anos). Foi realizado um estudo de desenho quase-experimental, em que os participantes foram avaliados em vários parâmetros antropométricos, fisiológicos e bioquímicos em oito momentos, em quatro dias diferentes. Apesar de não apresentarem diferenças significativas na velocidade (p = 0.58), através da interpretação do tamanho do efeito, é possível dizer que foi obtida uma pequena melhoria na velocidade de corrida para um ambiente de HS a intensidade moderada (2mmol/l) após a aclimação (ES = -0.2). Nas variáveis fisiológicas foram encontradas diferenças significativas no VO₂máx, dispendio energético total e RPE (p < 0.05) (NC x HC a 2mmol/l), também foram identificados tamanhos de efeito de importante aplicabilidade prática, principalmente, adaptações cardiovasculares (FC; PAS; PAD), e termo-regulatórias (TC; desidratação), que colaboram para atender de melhor forma às demandas associadas à prática de exercício físico em condições clássicas de ambiente de laboratório e de HS, corroborando em parte resultados de estudos anteriores a este. Do ponto de vista inflamatório, indicadores pró-inflamatórios como a IL-6 e IL-15 apresentaram diminuições nas suas concentrações após a aclimação ao ser comparadas com os valores prévios nas mesmas condições ambientais (p < 0.05). Embora as concentrações de IL-1 β estejam aumentadas nos atletas (p < 0.01), no momento de stresse por calor após a aclimação, as concentrações de IL-1ra também foram maiores nesse momento (p < 0.01), sugerindo uma tendência dos atletas para a manutenção de um equilíbrio pró e anti-inflamatório que contribuí para a boa funcionalidade do seu sistema imune. Foram encontradas diferenças significativas para os níveis de endotoxina sCD14 (p < 0.01), no ambiente de stresse térmico após a aclimação. Uma percentagem de desidratação de pelo menos 1.25% do peso corporal total, pode provocar aumentos nas concentrações de IL-1 β e associado a isto, aumento nos níveis de endotoxinas que escapam do trato gastrointestinal para o sangue, manifestado por aumentos nas concentrações de sCD14. Foi também confirmado que um protocolo de HA semelhante ao utilizado neste estudo (sete sessões em dias não contínuos), não provoca respostas inflamatórias crónicas em atletas bem treinados.

PALAVRAS-CHAVE: stresse térmico; frequência cardíaca (FC); consumo máximo de oxigénio (VO₂max); endotóxico; fisiológico; inflamatório; aclimação; tamanho do efeito (ES).

RESUMEN

El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto del ejercicio en condiciones ambientales clásicas de climaterio de laboratorio, así como en condiciones ambientales de estrés térmico (HS), en las respuestas fisiológicas (FC, VO₂máx, VE, QR, Lactato, Presión Arterial, Gasto Energético, Consumo Energético, RPE, Cortisol y Testosterona), inflamatorias (IL-6, IL-15, IL-10, TNF- α , IL- β , IL-1ra), e endotóxicas (sCD14), en atletas, antes y después de un protocolo de aclimatación al calor (HA). Las variables fisiológicas (con excepción del Cortisol y Testosterona), fueron evaluadas en dos intensidades (moderada = 2mmol/l y alta = 4mmol/l). También se realizaron mediciones de Temperatura Corporal (TC), y del estado de hidratación de los atletas. La muestra utilizada en este estudio fue compuesta por atletas de running de diferentes especialidades, que compiten a nivel nacional en Portugal (n = 8; 37.5 \pm 11.21 años). Se realizó un diseño cuasi-experimental, en el cual se evaluó a los participantes en distintos parámetros, antropométricos, fisiológicos y bioquímicos en ocho ocasiones, en cuatro días diferentes. Aunque no se presentaron diferencias significativas en la velocidad (p = 0.58), a través de la interpretación del tamaño del efecto, se puede decir que se obtuvo una pequeña mejora en la velocidad de carrera para un ambiente de HS a intensidad moderada (2mmol/l), después de la aclimatación (ES = -0.2). En las variables fisiológicas se encontraron diferencias significativas en VO₂max, gasto energético total y RPE (p < 0.05) (NC x HC a 2mmol/l), también se identificaron tamaños del efecto de importante aplicabilidad práctica, principalmente adaptaciones cardiovasculares (FC; PAS; PAD), y termorreguladoras (TC; deshidratación), que colaboran para atender de mejor manera las demandas asociadas a la práctica de ejercicio físico en condiciones ambientales clásicas de laboratorio y de HS, corroborando en parte los resultados de estudios previos. Desde el punto de vista inflamatorio, indicadores pro-inflamatorios como IL-6 e IL-15 mostraron disminuciones en sus concentraciones después de la HA en comparación con valores previos en las mismas condiciones ambientales (p < 0.05). Aunque las concentraciones de IL-1 β aumentan en los atletas (p < 0.01), en el momento de HS después de la aclimatación, las concentraciones de IL-1ra también fueron mayores en ese momento (p < 0.01), lo que sugiere una tendencia de los atletas a mantener la funcionalidad de su sistema inmune. Se encontraron diferencias significativas en la endotoxina sCD14 (p < 0.01) en el ambiente de HS después de la aclimatación. Un porcentaje de deshidratación de al menos 1.25% del peso corporal total puede provocar aumentos en las concentraciones de IL-1 β y, relacionado con esto, respuestas endotóxicas, manifestadas por aumentos en las concentraciones de sCD14. Se confirma que un protocolo de HA similar al utilizado en este estudio (siete sesiones en días discontinuos), no provoca respuestas inflamatorias crónicas en atletas bien entrenados.

PALABRAS CLAVE: estrés térmico; frecuencia cardíaca (FC); consumo máximo de oxígeno (VO₂max); endotóxico; fisiológico; inflamatorio; aclimatación; tamaño del efecto (ES).

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the effect of exercise in classic laboratory environmental conditions, as well as in conditions of environmental heat stress (HS), in physiological (HR, VO₂max, VE, QR, Lactate, Blood Pressure, Energy Expenditure, Energy Consumption, RPE, Cortisol and Testosterone), inflammatory (IL-6, IL-15, IL-10, TNF- α , IL - β , IL-1ra), and endotoxin (sCD14) responses in athletes, before and after a heat acclimation (HA) protocol. Physiological variables (with the exception of Cortisol and Testosterone) were evaluated at two intensities (moderate LAC= 2mmol/l and high LAC= 4mmol/l). Measurements of Body Temperature (TC), and the athlete's hydration status were also made. The sample used in this study was composed of running athletes from different specialties, who compete at the national level in Portugal (n = 8; 37.5 \pm 11.21 years). A quasi-experimental design was carried out, in which the participants were assessed for different anthropometric, physiological and biochemical parameters on eight occasions, on four different days. Although there were no significant differences in speed (p = 0.58), through the interpretation of the effect size, it can be said that a small improvement in running speed was obtained for a HS environment at moderate intensity (2mmol/l), after acclimation (ES = -0.2). In the physiological variables, significant differences were found in VO₂max, total energy expenditure and RPE (p < 0.05) (NC x HC at 2mmol/l). Effect sizes of important practical applicability were also identified, mainly in cardiovascular (HR; SBP; DBP), and thermoregulatory (TC; dehydration) adaptations, which collaborate to better meet the demands associated with the practice of physical exercise in classic laboratory and HS environmental conditions, partially corroborating the results of previous studies. From the inflammatory perspective, pro-inflammatory indicators such as IL-6 and IL-15 showed decreases in their concentrations after HA compared to previous values under the same environmental conditions (p < 0.05). Although IL-1 β concentrations were increased in athletes (p < 0.01), at the time of HS after acclimation, IL-1ra concentrations were also higher at that time (p < 0.01), suggesting a trend for athletes to maintain their pro and anti-inflammatory balance and functionality of their immune system. Significant differences in sCD14 endotoxin (p < 0.01) were found in the HS environment after acclimatization. A percentage of dehydration of at least 1.25% of total body weight can cause increases in IL-1 β concentrations and, associated to this, an increase in endotoxin leakage from the gut, manifested by increases in sCD14 plasma concentrations. It is confirmed that an HA protocol similar to the one used in this study (seven sessions on discontinuous days) did not cause chronic inflammatory responses in well-trained athletes.

KEYWORDS: heat stress; heart rate (HR); maximal oxygen uptake (VO₂max); endotoxic; physiological; inflammatory; acclimation; effect size (ES).

INTRODUÇÃO

A participação desportiva, além de ser avaliada por quantas medalhas foram ganhas, quanta fama tem o atleta ou quais outras recompensas foram obtidas, também é importante ser estudada do ponto de vista da saúde daqueles que competem. Não há mais qualquer dúvida de que a atividade física regular reduz o risco de mortalidade prematura em geral e de doença coronária (Haskell et al., 2007), hipertensão (MacDonald & Pescatello, 2019), obesidade e diabetes mellitus entre outras (Ljungqvist et al., 2009). A questão é se os benefícios para a saúde da participação desportiva superam ou pelo menos igualam os prejuízos que esta provoca, especialmente em atletas de alto nível.

Sarna, Sahi, Koskenvuo, and Kaprio (1993), estudaram a incidência de doenças crônicas e expectativa de vida de ex-atletas masculinos de classe mundial da Finlândia em desportos de resistência, desportos de força e desportos coletivos. A expectativa de vida global foi maior nos atletas de alto nível em comparação com um grupo de referência (75,6 versus 69,9 anos). O mesmo grupo também mostrou que a taxa de hospitalização mais tarde na vida foi menor para ex-desportistas que praticaram desportos de resistência e desportos de força em comparação também com o grupo de referência (Kujala, Sarna, Kaprio, & Koskenvuo, 1996). Isso resultou numa menor taxa de atendimento hospitalar para doenças cardíacas, doenças respiratórias e cancro. No entanto, os atletas foram mais propensos a ter sido hospitalizados ao longo da vida por distúrbios relacionados com outro tipo de doenças. Assim, as evidências sugerem que, embora haja um benefício de saúde geral da participação desportiva, as lesões e os efeitos adversos dos esforços máximos que são realizados nas competições desportivas pelos atletas e nas condições em que estas são realizadas, representam um efeito colateral significativo (Ljungqvist et al., 2009).

Atletas de uma variedade de desportos treinam e competem em ambientes que potencialmente representam um risco para a saúde e para o desempenho físico. Em

particular, atletas competindo em desportos ao ar livre nos meses de verão podem estar expostos a altas temperaturas e alta humidade durante o treino e a competição (Pyne, Guy, & Edwards, 2014).

Eventos desportivos em condições ambientais quentes e húmidas representam um grande desafio ambiental para manter o desempenho ideal de um atleta (Ely, Cheuvront, Roberts, & Montain, 2007). O exercício submáximo em condições ambientais quentes desafia o sistema cardiovascular ao atender às demandas termo-regulatórias sem comprometer as demandas metabólicas e circulatórias. A termorregulação pode ser comprometida durante o exercício submáximo prolongado por exigências circulatórias e metabólicas concorrentes que resultam num aumento da temperatura central (Tc) e fadiga associada (Guy, Deakin, Edwards, Miller, & Pyne, 2015). Segundo diferentes autores o exercício no calor pode prejudicar o desempenho físico prolongado quando comparado com condições mais frias (Aldous et al., 2019; Bergeron, 2019; Drust, Rasmussen, Mohr, Nielsen, & Nybo, 2005; Maughan & Shirreffs, 2004).

As federações internacionais responsáveis pela prática desses desportos estão cientes dos riscos subjacentes à saúde e implementaram medidas para ajudar a proteger a saúde e o bem-estar de seus atletas (Mountjoy et al., 2012).

Ljungqvist et al. (2009), realizaram um trabalho junto à Comissão Médica do Comitê Olímpico Internacional (COI), e reviram as evidências relevantes de informações científicas, recomendações práticas de segurança desenvolvidas e prioridades de pesquisa identificadas sobre os desafios ambientais enfrentados por atletas olímpicos e outros atletas de nível internacional. Grande parte deste trabalho concentra-se no modelo tradicional de termorregulação do stresse térmico. Considera-se que é de grande importância, ainda hoje, continuar com as investigações que possam ajudar os atletas a

mitigar as consequências na saúde que poderiam sofrer ao competir nestas condições ambientais.

Muitos dos principais eventos desportivos em anos recentes e num futuro próximo tem sido e/ou estão programados para locais com condições ambientais potencialmente quentes e/ou húmidas, como a Copa do Mundo de 2014 e as Olimpíadas de 2016 no Brasil, a Copa Mundial de Críquete 2015 na Austrália/Nova Zelândia, os Jogos Olímpicos 2020 em Tóquio e a Copa do Mundo de Futebol 2022 no Qatar. Assim, os efeitos da exposição ao calor, aguda e crônica, no desempenho físico são fatores significativos na gestão e preparação dos atletas (Guy et al., 2015).

O stresse por calor não essencial, pode ter efeitos significativos sobre o controle da termorregulação, portanto, uma alteração das funções metabólicas, o que por sua vez leva a uma deterioração do desempenho físico e como referido anteriormente, como efeito colateral, a consequências adversas sobre a saúde (Ng, Lee, Byrne, Ho, & Lim, 2008).

O modelo clássico de termorregulação do stresse, centra-se na equação de equilíbrio térmico relativo de produção de calor durante o exercício ou atividade física com diversos mecanismos de dissipação de calor (ou seja, a evaporação, a condução, convecção e radiação). A magnitude da resposta hipertérmica (impulsionada por condições ambientais e/ou exercício) tem sido considerado como o principal determinante de doenças associadas ao calor, incluindo síncope por calor, exaustão pelo calor e, em casos isolados, insolação por disfunção do sistema nervoso central e o início da cascata de coagulação, o que pode levar a insuficiência de múltiplos órgãos e morte (Singh, Kapoor, & Singh, 2013). Portanto, o calor produz a ativação de uma grande variedade de sistemas termorreguladores, imunes, inflamatórios e neuromusculares desde o tecido ao nível molecular (Pyne et al., 2014).

Os efeitos sobre o sistema humano, provocado pelo stresse por calor durante o exercício em condições quentes, têm sido investigados em estudos experimentais e observacionais. Segundo Walsh and Oliver (2016) e (Walsh & Whitham, 2006), os impactos geralmente são modestos e os atletas podem treinar e/ou competir em condições quentes, com a confiança de que é improvável que a função imunológica seja prejudicada, desde que sejam seguidas estratégias preventivas, sendo que a maioria das evidências disponíveis não corrobora a alegação de que o exercício no calor representa uma grande ameaça à função imune. No entanto, Pyne et al. (2014), mostraram que na realização de exercício em condições ambientais moderadas a quentes, há um aumento modesto nas concentrações circulantes de células natural killer (NK). Gill et al. (2015), em seu estudo, descobriram que os participantes de uma ultramaratona aumentaram exponencialmente a percentagem de citocinas pró-inflamatórias no sangue, por exemplo, a concentração de TNF-alfa tinha aumentado em mais de 150% no estágio 5 da competição, a proteína C-reactiva (PCR), já no estágio 3, tinha aumentado 889% em relação aos valores obtidos na sua linha de base, entre outros, o que demonstra que a prática de exercício em condições de stresse térmico, sim pode prejudicar a saúde dos participantes.

Heled, Fleischmann, and Epstein (2013), em seu estudo mencionam que as citocinas são peptídeos intracelulares que exercem efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios e podem atuar como mediadores e protetores na resolução da inflamação. A interação entre citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunorreguladoras é complexa, específica à situação e provavelmente dependente das condições ambientais, das exigências de exercícios e do nível individual de condicionamento físico, e este é um de vários motivos pelos quais é importante estudar o seu comportamento nestas condições e nesta população.

Em circunstâncias normais, a resposta inflamatória é transitória e diminui rapidamente à medida que a homeostase é restabelecida, mas, quanto mais tempo demore o exercício e/ou quanto mais intenso seja, mais citocinas pró-inflamatórias serão liberadas, e isso vai trazer consequências para a saúde e para a performance dos atletas (Gill et al., 2015).

Em anos recentes, tem havido evidências acumuladas de que o stresse térmico também pode ocorrer quando a termorregulação é comprometida pelas demandas circulatórias e metabólicas que levam à inflamação sistêmica (Epstein & Roberts, 2011; Gill et al., 2015; Lambert, 2008; Leon & Helwig, 2010). A redistribuição do volume sanguíneo dos órgãos internos para os tecidos periféricos aumenta a hipóxia e o stresse oxidativo e altera o epitélio gastrointestinal. As bactérias gram-negativas presentes no intestino formam o microbioma intestinal humano e sua liberação na circulação é considerada um dos principais moduladores intrínsecos da hipertermia (Pyne et al., 2014), isto porque essa alteração na membrana da mucosa intestinal, a danifica, aumentando a permeabilidade e causando o vazamento de endotoxinas na circulação (Zuhl et al., 2014). A endotoxemia induzida pelo exercício tem sido atribuída à translocação do lipopolissacarídeo (LPS) do intestino para a circulação portal (Pyne et al., 2014).

Embora a compreensão da complexa regulação fisiológica do stresse pelo calor continue a evoluir, é oportuno rever as causas, o manejo e o tratamento das doenças provocadas pelo calor (Pyne et al., 2014), assim como novas medidas para evitar os danos na saúde dos atletas provocados por isto.

1.1 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal determinar o efeito do exercício em condições ambientais clássicas de laboratório assim como em condições ambientais de stress térmico nas respostas fisiológicas, inflamatórias e endotóxicas em atletas, antes e depois de realizar um protocolo de aclimação ao calor.

ESTADO DA ARTE / REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO CORPO HUMANO PARA ACLIMATAÇÃO AO CALOR

Os seres humanos têm uma notável capacidade de se adaptar ao stresse térmico. Um indivíduo saudável e aclimatado ao calor pode tolerar a exposição prolongada a praticamente qualquer stresse térmico natural relacionado com o clima (Hori, 1995; Pandolf, Sawka, & Gonzalez, 1988; Sawka, 1996).

O stresse térmico resulta da interação de condições ambientais (ou seja, temperatura, humidade), trabalho físico (ou seja, produção metabólica de calor) e uso de roupas pesadas que impedem a perda de calor (Sawka, 1996). O stresse térmico ambiental e o exercício interagem para aumentar a tensão fisiológica, que se manifesta por altas temperaturas do core, da pele e do cérebro, aumento da tensão cardiovascular, maior dependência do metabolismo de carboidratos, resultante num desempenho aeróbico reduzido (Nybo, Rasmussen, & Sawka, 2014; Périard, Cramer, Chapman, Caillaud, & Thompson, 2011).

A aclimatação ao calor resulta em adaptações que reduzem os efeitos deletérios do stresse calorífico (Tabela 1). Normalmente, a adaptação ocorre por meio de ajustes morfológicos, químicos, funcionais e genéticos que diminuem a tensão fisiológica sob stresse (Adolph, 1964; Bligh, 1973). Durante a aclimatação ao calor, as adaptações se desenvolvem após repetidas exposições ao calor em ambientes artificiais/laboratoriais que são suficientemente stressantes para provocar sudorese profusa e elevar as temperaturas da pele e interna. Da mesma forma, a aclimatação ao calor designa a exposição a ambientes naturais que provocam respostas análogas (Sawka & Wenger, 1988).

A aclimatação ao calor é específica ao stresse imposto ao corpo humano. Por exemplo, a exposição passiva ao calor induz algumas respostas, nomeadamente uma

maior capacidade de dissipar o calor. Por outro lado, o treino físico em ambiente frio e seco resulta em adaptações metabólicas, bioquímicas, hematológicas e cardiovasculares. A aclimatação ao calor por meio de exercícios vigorosos induz respostas atribuídas tanto à exposição passiva ao calor quanto ao treino em ambientes frios. A Tabela 1 ilustra essas relações.

Segundo alguns autores, a aclimatação total ao calor pode requer até 14 dias, mas os sistemas do corpo adaptam-se à exposição ao calor em taxas variadas. As adaptações iniciais (1-5 dias iniciais), envolvem o aumento do controle da função cardiovascular, incluindo volume plasmático expandido, frequência cardíaca reduzida e habituação do sistema nervoso autônomo, que redireciona o débito cardíaco para os capilares da pele e músculos ativos. A expansão do volume plasmático como resultado do aumento da proteína plasmática e do aumento da retenção de NaCl varia de +3 a +27% e é acompanhada por uma diminuição de 15-25% na frequência cardíaca. Essa redução do esforço cardiovascular reduz a taxa de exaustão percebida, que é proporcional ao stresse cardiorrespiratório central, e que também diminui durante o exercício. A expansão do volume plasmático é um fenômeno temporário, decaindo durante os dias 8 a 14 de aclimatação ao calor (mediado pelas respostas hormonais reguladoras de fluido), e, em seguida, sendo substituído por uma redução, de maior duração, no fluxo sanguíneo para a pele que serve para aumentar o volume sanguíneo central (Armstrong, 1998; Travers, Nichols, Riding, González-Alonso, & Périard, 2020).

A aclimatação ao calor (HA), induz adaptações fisiológicas que melhoram a termorregulação, atenuam a tensão fisiológica, reduzem o risco de doenças graves pelo calor e melhoram o desempenho aeróbico e anaeróbico em ambientes quentes e potencialmente em ambientes temperados, também é associada ao stresse pelo calor do

exercício e pode, pelo menos em parte, restaurar os decréscimos observados no desempenho (Périard, Racinais, & Sawka, 2015; Racinais, Périard, Karlsen, & Nybo, 2015; Travers et al., 2020). As adaptações são adquiridas através da elevação frequente e repetida da temperatura de todo o corpo a um nível que estimula suficientemente as respostas termoeffetoras vasomotoras e sudomotoras (Travers et al., 2020). Normalmente, essas adaptações são evidentes por meio do aumento da sensibilidade e da produção de suor, aumento do fluxo sanguíneo da pele, redução da temperatura corporal, redução da tensão cardiovascular e melhoria do equilíbrio de fluidos (Périard et al., 2015).

As adaptações do exercício à aclimatação ao calor incluem: sudorese melhorada, fluxo sanguíneo da pele melhorado, temperatura corporal reduzida, tensão cardiovascular reduzida, equilíbrio hídrico melhorado, metabolismo alterado e proteção celular aprimorada. As magnitudes das adaptações são determinadas pela intensidade, duração, frequência e número de exposições ao calor, bem como pelas condições ambientais (ou seja, calor seco ou húmido).

A regulação da temperatura corporal durante o exercício no calor é crítica, devido ao grande potencial de hipertermia fatal. Adaptações termorregulatórias (ou seja, aumento da taxa de transpiração, início precoce da produção de suor), são associadas a ajustes cardiovasculares, que resultam em diminuição da temperatura corporal central. Esta resposta é maximizada após 5 a 8 dias de aclimatação ao calor. No entanto, as adaptações das glândulas sudoríparas são diferentes durante as exposições ao calor húmido e seco. A aclimatação ao calor húmido estimula uma maior taxa de transpiração do que a aclimatação a um ambiente de calor seco. Além disso, a velocidade ou taxa absoluta de transpiração influencia a termorregulação. Se a taxa de transpiração horária for baixa

(<400-600 mL), a adaptação da taxa de transpiração de todo o corpo periférico pode não ocorrer (Armstrong, 1998).

Tabela 1. Efeitos de 14 dias de protocolos de exercícios passivos e vigorosos em ambientes quentes e frios em respostas fisiológicas selecionadas.

Respostas fisiológicas	Sem exercício Ambiente quente	Com exercício Ambiente frio	Com exercício Ambiente quente
Temperatura corporal mais baixa no início da transpiração	++	+	++
Aumento da perda de calor por radiação e convecção (fluxo de sangue para a pele)	++	++	++
Aumento do volume plasmático	+	+	++
Frequência cardíaca diminuída	0	++	++
Diminuição da temperatura corporal central	++	+	++
Utilização prejudicada de combustível metabólico	0	++	++
Aumento do fluxo do sistema nervoso simpático (eferente)	+	++	++
Aumento do consumo de oxigênio	0	++	++
Maior economia durante o exercício	0	0	+
Adaptação ao exercício em um ambiente frio	0	++	++
Adaptação ao exercício em um ambiente quente	+	+	++
Diminuição da temperatura da pele	+	+	+

0 = efeito mínimo; + = efeito moderado; ++ grande efeito. (Adaptado de Armstrong and Maresh (1991)).

A conservação do cloreto de sódio (NaCl), também ocorre durante a aclimação ao calor. As perdas de NaCl no suor e na urina diminuem durante os dias 3-9 de aclimação, resultando em volume de líquido extracelular expandido. Subsequentemente, as perdas de NaCl no suor e na urina aumentam para níveis pré-aclimação quando o stresse fisiológico (ou seja, cardiovascular, térmico) é moderado. Armstrong, Hubbard, Askew, and Francesconi (1993), demonstraram que as perdas de NaCl durante um protocolo extenuante de 10 dias de aclimação ao calor estavam relacionadas com as concentrações plasmáticas de renina (PR) e aldosterona (A). Quando os indivíduos consumiram uma dieta com baixo teor de sal (4 g NaCl por dia) e uma dieta moderada em sal (8 g NaCl por dia), tanto PR quanto A aumentaram durante os primeiros 4 dias de aclimação ao calor, mas diminuíram durante os próximos 6 dias restantes de aclimação. O aumento da estabilidade cardiovascular, que ocorre nos dias de

aclimatação 1-4, permite desempenhos de exercício equivalentes com ambas as dietas e aparentemente reduz a estimulação e a necessidade de grandes elevações de PR e A. Não foram observadas alterações nos níveis plasmáticos de arginina vasopressina (AVP) ao longo tempo em ambos os grupos dietéticos, possivelmente porque a ingestão de água por hora igualou a perda de líquidos no suor. Normalmente, a síntese de AVP é estimulada por um aumento da osmolaridade plasmática ou por alterações na pressão arterial, volume plasmático e fluxo plasmático renal ou hepático. Assim, é improvável que a capacidade de manter o exercício com sucesso durante os dias seguintes ao processo de aclimatação ao calor esteja especificamente relacionada com a ação de hormonas que regulam o equilíbrio hidroeletrólítico. Isto é particularmente verdadeiro quando o equilíbrio de sal foi alcançado (Armstrong, 1998; Armstrong et al., 1993).

O excesso de água e eletrólitos na dieta não acelera o processo de aclimatação ao calor (Armstrong, 1998; Sawka, Latzka, Matott, & Montain, 1998). Quando existe desidratação ou deficiência de sal, as respostas cardiovasculares e termorregulatórias podem ser afetadas negativamente e o risco teórico de insolação pode ser aumentado. A monitorização diária consistente do peso corporal permitirá que os atletas reconheçam um défice hídrico, que requer ingestão de líquidos (perdas de 2-3% do peso corporal), redução da duração/intensidade do treino (perdas de 4 a 6%) ou a consulta de um médico especializado (em perdas superiores a 7%) (Armstrong, 1998; Périard, Travers, Racinais, & Sawka, 2016; Sawka et al., 1998). De acordo com o que foi referido acima, apesar de o estado de hidratação das pessoas não ser um indicador essencial para os processos de aclimatação ao calor, a recomendação para concluir estes tratamentos cuidando da saúde dos sujeitos é tentar que estejam sempre num estado de euhidratação (Armstrong, 1998; Armstrong et al., 1993; Périard et al., 2016).

A concentração plasmática de cortisol geralmente indica o stresse experimentado pelo corpo. Humanos bem hidratados e aclimatados ao calor não apresentam alteração no cortisol plasmático quando se exercitam num ambiente quente. Sob as mesmas condições, a falta de aclimação ao calor e a desidratação podem resultar em grandes aumentos no cortisol plasmático. Quando o exercício é intenso e a temperatura corporal central aumenta acentuadamente, a concentração plasmática de cortisol aumenta durante os dias iniciais de aclimação ao calor, mas retorna aos níveis de controle após 8 dias de aclimação, refletindo uma redução no esforço de todo o corpo (Armstrong, 1998; Périard et al., 2011).

O treino físico realizado num ambiente frio pode ou não melhorar a economia do exercício, enquanto o metabolismo pode ser afetado pela aclimação ao calor, na qual o consumo de oxigénio é reduzido durante o exercício submáximo. O exercício de subir escadas provoca maiores efeitos de aclimação comparativamente com o tapete rolante e o ciclo ergómetro que produzem alterações menores, mas ainda assim estatisticamente significativas. O mecanismo fisiológico da diminuição do consumo submáximo de oxigénio não foi exatamente definido, mas existem 3 teorias: (a) o fluxo sanguíneo para a pele é aumentado, reduzindo assim o volume sanguíneo central, o retorno venoso ao coração e o débito cardíaco; (b) A parte do débito cardíaco que supre os músculos diminui; (c) O recrutamento de fibras musculares muda de fibras predominantemente oxidativas para fibras glicolíticas. A aclimação ao calor reduz a utilização de glicogénio muscular e a concentração de lactato muscular pós-exercício (Armstrong, 1998; Périard et al., 2016).

2.1.1. FATORES QUE AFETAM A ACLIMATAÇÃO AO CALOR DOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Acredita-se que muitos fatores podem influenciar a capacidade de aclimação ao exercício num ambiente quente. Por exemplo, anteriormente, pensava-se que as pessoas mais velhas toleravam menos o calor do que as pessoas mais jovens. Foi demonstrado que homens de meia-idade (> 45 anos), apresentaram frequências cardíacas e temperaturas retais mais altas e taxas de transpiração mais baixas do que homens jovens, durante o exercício no calor, antes e durante o exercício no calor, e antes e depois da aclimação ao calor. Da mesma forma, estudos realizados no início da década de 1960 sugeriram que as mulheres eram menos tolerantes ao exercício no calor do que os homens. No entanto, pesquisas recentes modificaram ou reverteram essas visões. É agora reconhecido que existem poucas diferenças relacionadas ao sexo quando sujeitos masculinos ou femininos são pareados por características físicas e morfológicas relevantes. Reconhece-se também que as diferenças entre jovens e idosos não se devem necessariamente ao envelhecimento em si, mas podem ser decorrentes de outros fatores, como diminuição do volume de treino e menor potência aeróbica máxima ($VO_{2\text{máx}}$) (Armstrong, 1998).

Sem levar em consideração o treino físico, o $VO_{2\text{máx}}$ geralmente influencia as respostas fisiológicas durante o desenvolvimento da aclimação ao calor. Indivíduos com $VO_{2\text{máx}}$. (>60 mL/kg/min) apresentam respostas superiores de frequência cardíaca e temperatura retal, e geralmente atingem um estado estável de aclimação ao calor mais rapidamente quando comparados com indivíduos com $VO_{2\text{máx}}$. baixo (<40 mL/kg/min) (Armstrong, 1998).

2.2. ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNITÁRIO E EXERCÍCIO

O nosso corpo dispõe de um importante sistema, o sistema imunitário, constituído por órgãos linfoides primários e secundários, uma grande variedade de células e múltiplos fatores solúveis. É, sobretudo, nos órgãos linfoides secundários que são desencadeadas as respostas imunológicas que permitem não só proteger o organismo contra agressões do exterior (por exemplo, microrganismos, células ou tecidos de um organismo diferente, fármacos, toxinas, etc.) ou do interior (por exemplo, células internas alteradas ou cancerosas), mas que é também fundamental para manter equilíbrio homeostático do organismo (Arosa, Cardoso, & Pacheco, 2012).

O corpo humano está constantemente sob ataque de agentes invasores (ex., bactérias, vírus e fungos) que promovem infeção. Ao reconhecer, atacar e destruir esses agentes invasores no organismo, o sistema imunitário protege o corpo contra infeção e tem um importante papel na manutenção da homeostase corporal (Brolinson & Elliott, 2007). Portanto, o sistema imunitário é um sistema homeostático crucial no reconhecimento do próprio e na 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, o inato (não específico) e o adaptativo (específico), é importante notar que ambos os braços deste sistema funcionam sinergicamente durante a resposta imune (Brolinson & Elliott, 2007; Simpson, Kunz, Agha, & Graff, 2015).

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, as citocinas interferão α e β 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 infecções 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 infectadas com vírus ou transformadas (Brolinson & Elliott, 2007).

A imunidade adquirida (também conhecida como imunidade adaptativa ou específica) é delineada para combater infecções, impedindo a colonização de agentes patogênicos 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, respectivamente, 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⁺ podem ser divididas em dois fenótipos principais, células T CD4⁺ 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- γ (IFN- γ) 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 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⁺). 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 com 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 (T_{regs}) de ocorrência natural, expressa o fenótipo CD4⁺CD25^{bright} 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-β) (Walsh et al., 2011).

O exercício físico tem um profundo efeito no funcionamento normal do sistema imune. É geralmente aceite que períodos prolongados de treino/exercício irregular e não contínuo intenso podem deprimir a imunidade, enquanto o exercício de intensidade moderada é benéfico. Também é aceite que mudanças induzidas pelo exercício na função imune inata alteram a suscetibilidade a doenças infecciosas do trato respiratório superior que podem também ser o resultado do efeito anti-inflamatório do exercício regular (Gleeson, 2007).

O conceito de que o exercício pode ter efeitos positivos e negativos no risco de infeção foi introduzido pelo doutor David Nieman quando descreveu a relação entre a intensidade e o volume do exercício praticado e o risco de Infecções do Trato Respiratório Superior (ITRS), pela curva “J” (Nieman, 1994). Neste modelo, o risco de infeção muda em função da intensidade e quantidade de exercício que foi executada (Figura 1). 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).

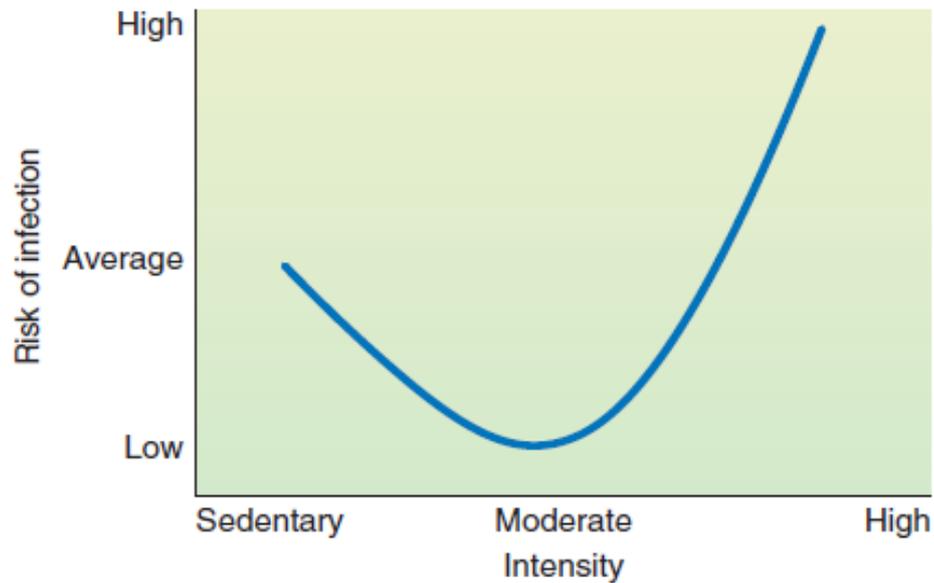


Figura 1. Modelo em forma de J da relação entre o risco de ITRS e o volume de exercício. Adaptado de (Nieman, 1994).

Este modelo sugere que exercícios moderados podem diminuir o risco de infecção respiratória, enquanto que quantidades excessivas para intensidade ou duração do exercício podem aumentar o risco (Nieman, 1994).

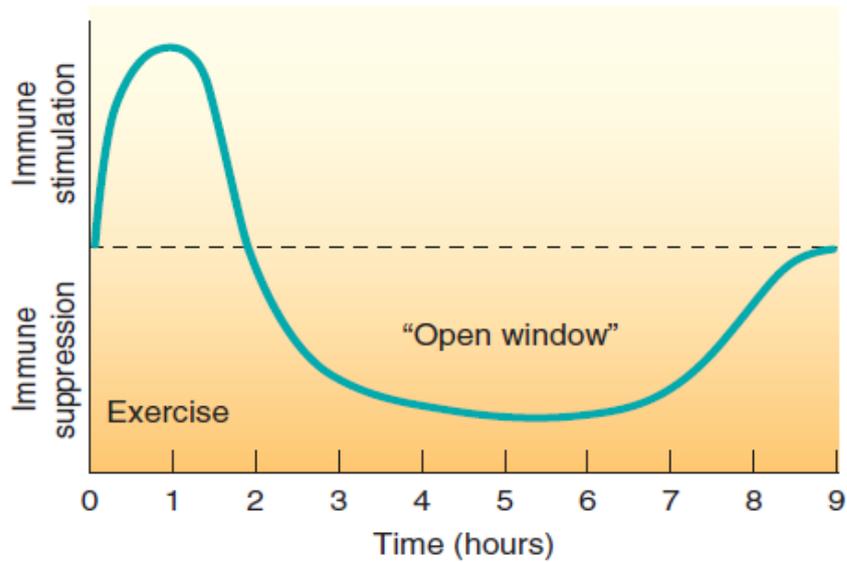


Figura 2. Teoria da “Janela aberta”. Adaptada de Brolinson and Elliott (2007).

A teoria da “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, maratonas), 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: diminuição dos níveis sanguíneos de células B, células T e células citotóxicas, diminuição da atividade das células NK e função das células T, diminuições na fagocitose de neutrófilos, diminuição nos níveis de IgA salivar e aumentos de citocinas pró e anti-inflamatórias.

2.2.1 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, 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.

Tabela 2. Efeitos do exercício intenso sobre o sistema imunitario.

	Durante o exercício	Após o exercício
Neutrófilos	↑	↑↑
Monócitos	↑	↑
Células T CD4 ⁺	↑	↓
Células T CD8 ⁺	↑	↓
Células B CD19 ⁺	↑	↓
Células CD14	↑	↑
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- α	↑	↑
Concentração plasmática de IL-1	↑	↑
Concentração plasmática de IL-1ra	↑↑	↑
Concentração plasmática de IL-6	↑↑	↑
Concentração plasmática de IL-10	↑	↑
Concentração plasmática de TNF-R	↑	↑
Concentração plasmática de MIP-1, IL-8	↑	↑

↑ aumento; ↓ diminui; ↑↑ aumento acentuado; TNF- α 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). Para informação adicional sobre CD14, (Gleeson et al., 2011).

2.2.1.1 RESPOSTA DA IMUNIDADE INATA CELULAR 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 et al., 2014). É possível para atletas acostumar o corpo a ter uma supressão transitória da função imunológica após um exercício intenso, que pode ser devido ao comprometimento da função dos neutrófilos e linfócitos (Santos et al., 2013).

O exercício agudo resulta numa primeira neutrofilia rápida e profunda (aumento no número de neutrófilos no sangue), seguida por um segundo aumento retardado na

contagem de neutrófilos no sangue algumas horas depois, cuja magnitude está relacionada com a intensidade e a duração do exercício. O aumento inicial é provavelmente devido à demarginação causada por um aumento no stress e catecolaminas, enquanto o aumento posterior pode ser devido à libertação, induzida pelo cortisol, de neutrófilos com origem na medula óssea. A desgranulação de neutrófilos não estimulada, fagocitose e atividade de explosão oxidativa são aumentadas por uma sessão aguda de exercício, mas há uma desgranulação reduzida e explosão oxidativa em resposta à estimulação bacteriana que pode durar muitas horas. Isso indica que, embora o exercício possa mobilizar neutrófilos altamente funcionais para a circulação, na recuperação sua capacidade de responder a estímulos exógenos pode ser diminuída. Os neutrófilos marginalizados são mais maduros do que os neutrófilos liberados recentemente e isso provavelmente tem implicações para o estudo do exercício sobre a função dos neutrófilos, embora isso não pareça influenciar a atividade de explosão respiratória (Walsh et al., 2011).

O consenso publicado por Walsh et al. (2011), diz, em relação a neutrófilos: que 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 et al., 2011). Em relação à atividade fagocitária das células imunitárias inatas, a posição dos especialistas, dizem 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 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 (stresse) e da depressão induzida por catecolaminas da expressão de moléculas de adesão (Timmons, Tarnopolsky, Snider, & Bar-Or, 2006). Sobre as células NK, o consenso diz que, parece haver um diferencial de mobilização em que as células NK CD56^{bright} são menos sensíveis do que as CD56^{dim}. Isto pode indicar uma reduzida capacidade de defesa contra agentes patogénicos durante o exercício agudo, uma vez que as células CD56^{bright} 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 et al., 2011).

Muitos estudos examinaram a influência do exercício agudo nos monócitos sanguíneos CD14⁺ humanos (Mo's), que são células relativamente imaturas destinadas a se tornarem Mφs do tecido. O exercício agudo resulta numa monocitose transitória (2h) e muito provavelmente representa um deslocamento de Mo's do reservatório marginal para o circulante. Isso pode ocorrer como resultado de liberação hemodinâmica e / ou cortisol ou induzida por catecolaminas do endotélio vascular. De fato, a administração do betabloqueador propranolol pode reduzir a monocitose induzida pelo exercício e a administração de adrenalina (epinefrina) causa monocitose. Também há relatos de que o exercício pode afetar o fenótipo monocitário, as proteínas da superfície celular e a expressão de citocinas (Walsh et al., 2011; Wonner, Wallner, Orsó, & Schmitz, 2018). Por exemplo, em resposta ao exercício agudo, há uma mobilização preferencial de Mo's expressando CD14⁺/CD16⁺ que exibem um fenótipo pró-inflamatório em relação a CD14⁺/CD16⁻ Mo's clássicos. Pode ser que essas células marginadas tenham uma função inflamatória mais madura para entrar nos tecidos e sejam eliminadas do endotélio em resposta ao exercício. Curiosamente, a percentagem dessas células CD14⁺/CD16⁺ é reduzida na recuperação, talvez indicando remarginalização ou recrutamento pelo tecido. O exercício agudo também reduz a expressão de receptores tipo toll (TLR) 1, 2 e 4 em CD14⁺ Mo's. No entanto, até que ponto essas mudanças refletem uma diminuição real em relação às mudanças da população de Mo não está claro. Na tentativa de conciliar isso, (Simpson et al., 2009), examinaram as proteínas da superfície celular em subpopulações de Mo em resposta ao exercício agudo. Eles descobriram que a expressão de TLR 4 e HLA, foi alterada em Mo's CD14⁺ totais, mas também em populações individuais de Mo, indicando que as mudanças na expressão da superfície celular não são influenciadas

apenas por mudanças induzidas por exercício em Mo's subpopulações de sangue. Vários estudos examinaram a produção de citocinas pelos Mo's após o exercício agudo, descobrindo que, embora os níveis espontâneos de citocinas nas células CD14⁺ mudem pouco (Simpson et al., 2009), o exercício agudo reduz os níveis de interleucinas estimuladas pelo receptor TLR (IL-6, IL-1 e a TNF- α), talvez como consequência da expressão reduzida de TLR.

2.2.1.2 RESPOSTAS DA IMUNIDADE ADQUIRIDA AO EXERCÍCIO AGUDO

A imunidade adquirida combate infecções prevenindo a colonização de patógenos e destruindo microorganismos invasores. É iniciado, na maioria dos casos, pela apresentação de antígeno às células T auxiliares, dentro do sulco de ligação de peptídeos de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade em células apresentadoras de antígeno (Bishop, 2013).

Com base nas citocinas que produzem, os clones de células T auxiliares podem ser divididos em dois fenótipos principais: tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2). As células Th1 desempenham um papel importante na defesa contra patógenos intracelulares e as células Th2 estão envolvidas na proteção contra parasitas extracelulares e na estimulação da produção de anticorpos por células B (AB). As células T citotóxicas também podem ser classificadas em células tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) com base nos seus perfis de secreção de citocinas (Bishop, 2013).

Estudos longitudinais em que sujeitos, previamente sedentários, após 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 elevadas, 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 et al., 2011).

A proliferação de células T diminui, tanto durante como após o exercício. Este parece ser um efeito consistente sempre que mitogénios 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 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 et al., 2014).

Por isso, o exercício extenuante é geralmente associado com um aumento dos sintomas de ITRS em atletas (Tossige-Gomes et al., 2014), sugerindo que o exercício de alto volume pode ter um efeito imunossupressor (Gleeson, 2007). Os mecanismos imunitários que fundamentam este aparente aumento da suscetibilidade à infecção em atletas são, provavelmente, multifatoriais e incluem perturbações do compartimento de células T (Tossige-Gomes 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 Th 2 (Steensberg 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 (Minuzzi et al., 2018).

Tem que ser reconhecida a distinção epidemiológica entre o termo genérico “atividade física” e a categoria específica de “exercício”, que implica atividade para uma finalidade específica, como melhoria da condição física ou competição. A atividade física extrema de qualquer tipo pode ter implicações para o sistema imunitário. No entanto, por causa de seu componente emotivo, o exercício provavelmente terá um efeito maior (Walsh et al., 2011).

2.2.2 EXERCÍCIO CRÓNICO E FUNÇÃO IMUNE

Anteriormente já foi comentado 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 3).

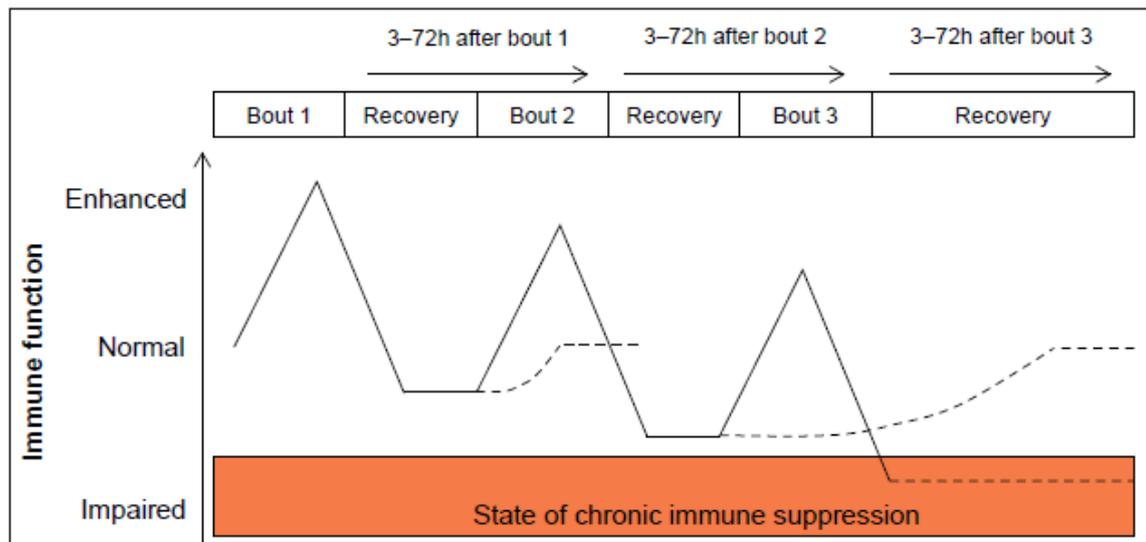


Figura 3. Hipótese da “Janela aberta”. Adaptado de (Simpson et al., 2015).

Uma única sessão de exercício está associada com um aumento inicial na função imunológica, que é rapidamente seguido por um período transitório de imunodepressão (“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 (Simpson et al., 2015).

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

2.2.2.1 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 crónica) 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 libertação de adipocinas pró-inflamatórias), mas também através da indução de um ambiente anti-inflamatório, em cada série de exercício (figura 4) (Gleeson et al., 2011). Gleeson et al. (2011), apresentaram três possíveis mecanismos dos efeitos anti-inflamatórios do exercício: a redução da massa de gordura visceral; aumento da produção e libertação de citocinas anti-inflamatórias pela contração muscular (miocinas); redução na expressão dos 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).

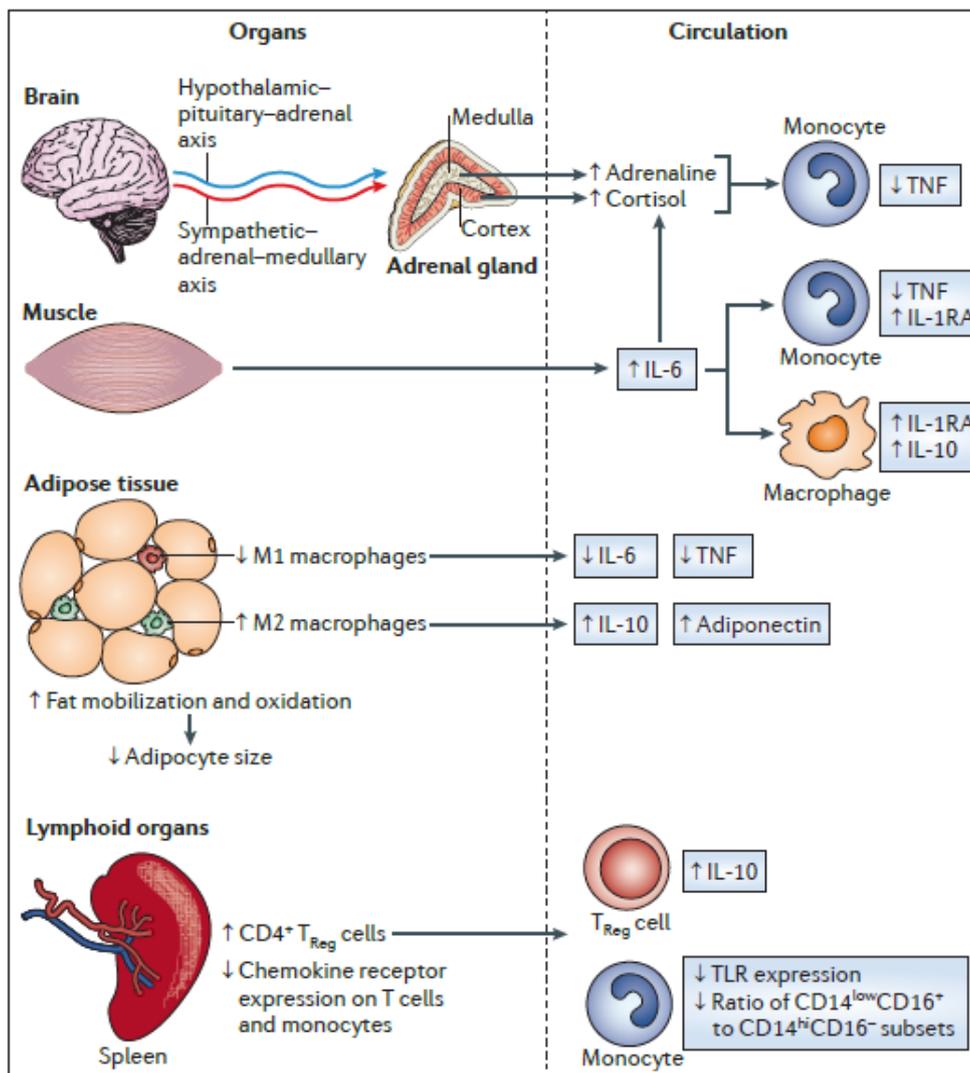


Figura 4. Mecanismos potenciais que contribuem para os efeitos anti-inflamatórios do exercício. Adaptado de Gleeson et al. (2011).

A figura anterior explica que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático (SNS), leva à liberação de cortisol e adrenalina do córtex e medula adrenal, respectivamente. Estas hormonas inibem a liberação do TNF- α pelos monócitos. A IL-6, produzida pela contração do músculo esquelético também regula negativamente a produção de TNF- α pelos monócitos e pode estimular ainda mais a liberação de cortisol. Elevações agudas de IL-6 estimulam a liberação do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra), de monócitos e macrófagos, aumentando assim as

concentrações circulantes desta citocina anti-inflamatória. O treino físico mobiliza as células T_{regs} (que são uma fonte importante da citocina anti-inflamatória IL-10), e diminui a proporção de monócitos inflamatórios (CD14^{low}CD16⁺), para monócitos clássicos (CD14^{hi}CD16⁻). Após o exercício, os monócitos CD14^{hi}CD16⁻ expressam menos TLR4 e, assim, induzem uma resposta inflamatória reduzida marcada por níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de tecido adiposo reduzida. O exercício também aumenta as concentrações plasmáticas das principais quimiocinas das células imunes inflamatórias; elevações repetidas de tais quimiocinas podem levar a uma regulação negativa de seus receptores celulares, resultando em infiltração tecidual reduzida. A redução da massa de tecido adiposo e do tamanho dos adipócitos, juntamente com a redução da infiltração de macrófagos e a mudança de um fenótipo de macrófagos M1 para M2, podem contribuir para uma redução na libertação de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- α) e um aumento na libertação de citocinas anti-inflamatórias (como adiponectina e IL-10) do tecido adiposo (Gleeson et al., 2011).

2.2.3. EXERCÍCIO EM CONDIÇÕES DE STRESSE TÉRMICO: RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

A hipótese de que ambientes extremos podem afetar a função imunológica durante o exercício foi proposta pela primeira vez no final da década de 1990. Considerando que o exercício e o stresse ambiental afetam a função imunológica, é fácil entender por que o Dr. Shephard levantou a hipótese de que colocá-los juntos causaria mais perturbações na função imunológica (Shephard, 1998).

Os stressores são combatidos com as respostas hormonais coordenadas monitorizadas pelo sistema nervoso central (Figura 3; (Jonsdottir, 2000)). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o eixo medular simpatoadrenal (SAM) fornecem os

sinais pelos quais o cérebro modula a função imunológica para se opor aos stressores. O cortisol é produzido pelo eixo HPA e o eixo SAM regula a produção de catecolaminas. Evidências apoiam uma interação entre respostas neuroendócrinas e respostas imunes ao exercício (Hoffman-Goetz & Pedersen, 1994).

É relativamente pouco conhecida a resposta imunitária e inflamatória dos efeitos da prática de exercício em ambientes extremos, especificamente para este trabalho no ambiente de stresse térmico. Os efeitos do exercício no sistema imunitário durante o treino e competição sob stresse térmico foram estudados anteriormente (Barberio et al., 2015; Costello et al., 2018; Kanikowska et al., 2012; Lee & Thake, 2017; Walsh & Oliver, 2016; Walsh & Whitham, 2006). Uma miríade de alterações agudas em marcadores imunitários foi relatada; Pyne et al. (2014), descobriram que o exercício num ambiente moderado a quente provoca um aumento modesto nas concentrações circulantes de células NK. Gill et al. (2015), descobriram que, em comparação com a linha de base, os participantes que completaram uma ultramaratona aumentaram exponencialmente a percentagem de citocinas pró-inflamatórias no sangue. Por exemplo, a concentração de TNF- α aumentou mais de 150% na 5ª etapa da competição e a PCR, 889% na 3ª etapa.

A resposta inflamatória ao exercício é transitória em condições normais e diminui rapidamente à medida que a homeostase é restaurada; no entanto, mais citocinas pró-inflamatórias são libertadas à medida que a duração e a intensidade do exercício aumentam, o que pode levar a consequências indesejáveis para a saúde e desempenho físico dos atletas (Gill et al., 2015). Evidências recentes sugerem que o stresse térmico também pode ocorrer quando a termorregulação é comprometida por demandas circulatórias e metabólicas que levam à inflamação sistêmica (Epstein & Roberts, 2011; Gill et al., 2015; Lambert, 2008).

2.2.3.1 CITOCINAS

As citocinas representam um grande grupo de moléculas de sinalização e comunicação delular, particularmente de glicoproteínas e peptídeos de baixo peso molecular com uma função privilegiada no sistema imunitário, mas abrangendo outras áreas como as da inflamação e reparação tecidular, a hematopoiese e o eixo neuroimunoendócrino (Arosa et al., 2012).

A designação genérica de citocinas é a mais abrangente, embora de acordo com a respetiva origem celular, função, ou alvo, possam ser apelidadas de interleucinas, fatores de crescimento, fatores de necrose, interferões, quimiocinas, adipocinas e outros. As quimiocinas representam um grupo de citocinas que partilham propriedades quimiocinéticas e que, por isso, são especialmente importantes nos mecanismos de orientação e movimentação celulares, tão característicos, por exemplo, nos processos inflamatórios. As citocinas, como moléculas fundamentais na comunicação celular, são capazes de dar sentido a inúmeras funcionalidades biológicas, estabelecendo elos de ligação vitais para a resposta imunoinflamatória. A determinação laboratorial de citocinas e a respetiva utilização terapêutica, cada vez são mais minuciosos, na percepção dos mecanismos e do sentido funcional da resposta imunoinflamatória individual (Arosa et al., 2012).

São considerados mensageiros intercelulares envolvidos nas interações entre células, onde sendo que, independente da origem, músculo esquelético ou produzida por outras células (e.g., 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 (Arosa et al., 2012). Elas participam na regulação do apetite, no metabolismo glicémico e lipídico, controlam a temperatura do corpo, fadiga, interferem na sensibilidade à insulina e atuam nos mecanismos de hipertrofia e atrofia muscular (Minuzzi, Carvalho, et al., 2017; Peake, Della Gatta, Suzuki, & Nieman, 2015).

2.2.3.1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CITOCINAS NA RESPOSTA

IMUNOINFLAMATÓRIA

Arosa et al. (2012), comentam que a resposta imunológica, quer na sua vertente inata quer adaptativa ou específica, é citocino-dependente, caracterizando-se, no que diz respeito à funcionalidade desses mediadores, pela reprodução das suas propriedades fundamentais, nomeadamente:

- Ação autócrina, parácrina e endócrina. Presença de um conjunto de proteínas solúveis ou péptidos (interleucinas, interferões, fatores estimuladores de colónias e quimiocinas), atuantes como reguladores humorais em concentrações de nano ou picomoles, produzidas por populações celulares diversas, predominantemente leucocitárias, mas também por células do endotélio vascular e células parenquimatosas dos tecidos, com ação autócrina, parácrina e endócrina, destacando-se pela sua relevância patológica a IL-1 α e β , o TNF- α , a IL-6, quimiocinas como MIP-1 α e β , IP-10, MIG, I-TAC, MCP-1 e 2 e RANTES, a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, e reguladora o TGF- β e a IL-10;
- Ação pleiotrópica, redundante, antagónica ou sinérgica, e de origem não exclusiva em determinada população celular. Cada citocina individual pode ter origem

múltipla em diferentes populações celulares, não existindo exclusividade na sua síntese (exclusão do modelo uma célula/uma citocina/uma célula-alvo). A ação de cada citocina pode ser diferente consoante a natureza da célula-alvo (ação pleiotrópica) e diferentes citocinas podem exercer o mesmo efeito biológico em determinada população celular (ação redundante). Os efeitos biológicos celulares de cada citocina podem potenciar-se (sinergia) ou ser antagónicos. A ação antagónica de grupos de citocinas tem como consequência a natural autorregulação ou modulação pela expressão simultânea de mediadores com funções opostas. Os efeitos biológicos de citocinas classificadas como pro-inflamatórias tais como o IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 e IL-17 são atenuados pela ação de citocinas com características anti-inflamatórias tais como TGF- β , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Esta regulação do balanço de citocinas com propriedades antagónicas é essencial para o controlo da resposta imunoinflamatória em diversas situações de agressão infecciosa, patologia autoimune, resposta imunológica a tecidos e órgãos transplantados, com o objetivo de limitar o dano ou lesão dos tecidos envolvidos na resposta imunológica;

- Padrão de início-manutenção-finalização dos efeitos biológicos das citocinas, influenciado de forma diversificada por fatores reguladores da expressão génica, por bloqueadores da ligação aos recetores específicos e da sinalização intracelular. Cada citocina apresenta um perfil de início-manutenção-finalização do seu efeito biológico, variável em termos de duração temporal para cada tipo de citocina, que é regulado de forma diferente, por mecanismos que atuam a nível da expressão génica (ativadores ou inibidores de fatores de transcrição do ADN), a nível da ligação aos recetores específicos e a nível do estímulo ou bloqueio da sinalização intracelular.

2.2.3.1.2 CITOCINAS ASSOCIADAS À RESPOSTA INFLAMATÓRIA

Avanços na tecnologia, e um melhor conhecimento na fisiopatologia de vários processos inflamatórios têm facilitado este conhecimento permitindo, agora, saber-se que a inflamação se pode manifestar de maneiras diferentes. A inflamação pode “disfarçar-se”, dependendo do ambiente em que se está a desenvolver, do ponto em que a resposta inflamatória foi analisada (fase inicial, tardia ou de resolução) e da sua etiologia (Arosa et al., 2012).

Se nos limitarmos às citocinas inflamatórias, a lista ainda assim parece interminável, temos o TNF e várias interleucinas como as IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-32 e IL-33, entre outras, dependendo do motivo da sua origem (Arosa et al., 2012). De seguida caracterizaremos algumas das mais estudadas no âmbito do exercício.

2.2.3.1.3 *TNF- α*

O fator de necrose tumoral (TNF), é uma citocina pleiotrópica com funções importantes na homeostasia e patogénia de doenças (Kallioliás & Ivashkiv, 2016). É uma citocina pro-inflamatória multifuncional, considerado um agente anti-tumoral desde a sua descoberta há três décadas, e tem um papel importante na resposta inflamatória através da sua interferência na proliferação celular, diferenciação, apoptose e função endotelial. O indutor mais potente de TNF por monócitos é o lipopolissacárido (LPS), agindo através do TLR2 e do TLR4 (Arosa et al., 2012).

A nível celular, o TNF é um potente ativador de neutrófilos, mediando a adesão, quimiotaxia e a desgranulação celular, interagindo com as células endoteliais para induzir o aparecimento de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-

1); a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e a E-selectina, permitindo a saída de granulócitos da circulação sanguínea para o local da inflamação (Arosa et al., 2012).

A superfamília do TNF, é composta de 19 ligantes e 29 recetores, e desempenha funções muito diversificadas no corpo. TNF- α 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 NF-KB, vias de apoptose, cinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína ativada por mitogénio p38 cinase (p38MAPK), e c-Jun quinase N-terminal (JNK) (Figura 2.13) (Aggarwal, Gupta, & Kim, 2012; Kalliolias & Ivashkiv, 2016).

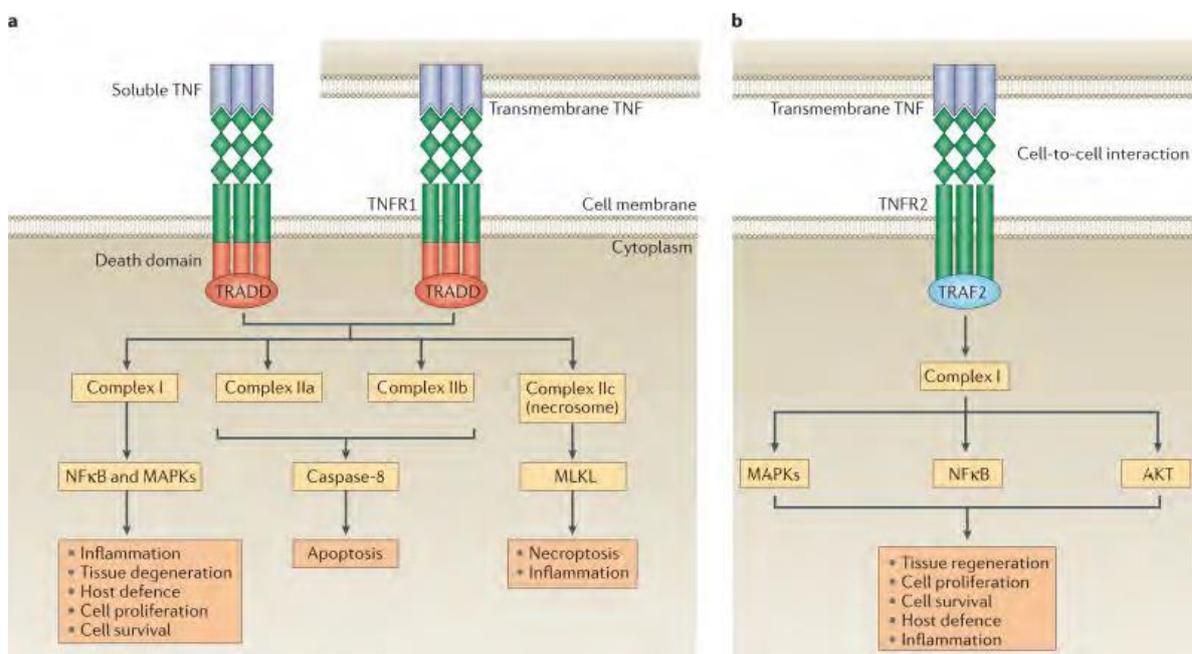


Figura 5. Vias de sinalização de células ativadas por TNF. Adaptada de Kalliolias and Ivashkiv (2016).

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 NF κ B31; e o recrutamento de TRADD, FADD e caspase-8, conduz à ativação da caspase-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 ao TNF- α na maioria dos casos resulta na geração de espécies reativas de oxigênio, conduzindo à ativação de MKK7 e JNK (Aggarwal et al., 2012). Junto com a IL-1 β , o TNF- α faz parte das duas primeiras citocinas na cascata inflamatória. TNF- α e IL-1 β estimulam a produção de IL-6. Altos níveis de TNF- α estão associados com mortalidade, demência, fragilidade, doença de Alzheimer e aterosclerose em idosos. Por essas razões o TNF- α poder ser um bom biomarcador do envelhecimento (de Gonzalo-Calvo et al., 2010).

2.2.3.1.4 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 à 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 às 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 à 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 6 para detalhes).

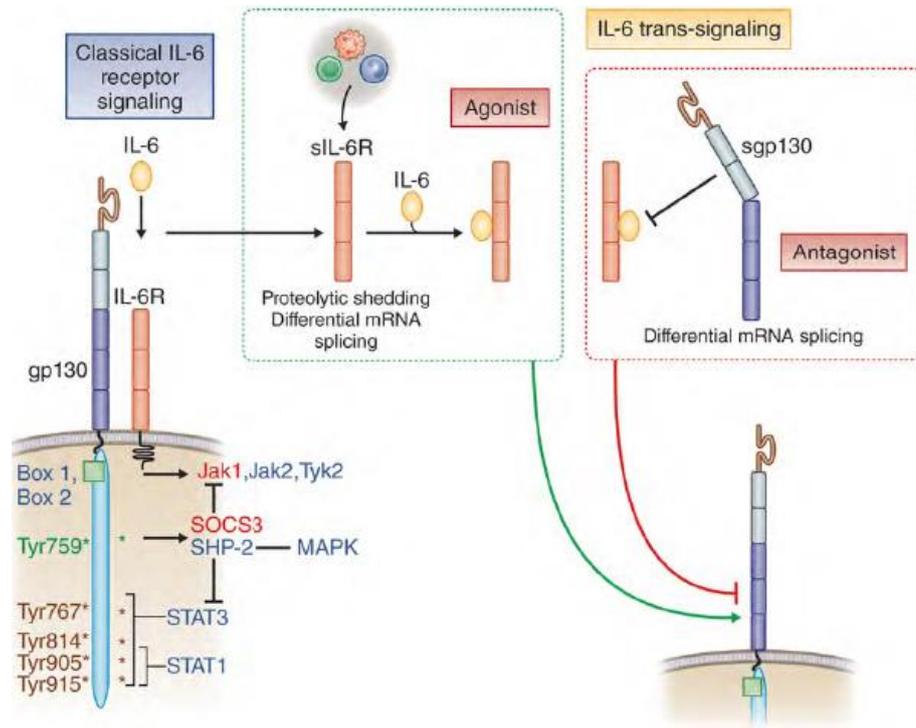


Figura 6. Sinalização do recetor da IL-6 (Adaptado de Hunter and Jones (2015)).

A sinalização clássica do receptor de IL-6 ocorre em células que expressam IL-6R (CD126) e gp130 (CD130). IL-6R é um recetor que se liga à IL-6, mas não tem propriedades de sinalização. A subunidade gp130 é o receptor 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 à 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 se liga 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 MAPKs. 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 (Hunter & Jones, 2015).

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 α -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 7) (Scheller, Chalaris, Schmidt-Arras, & Rose-John, 2011).

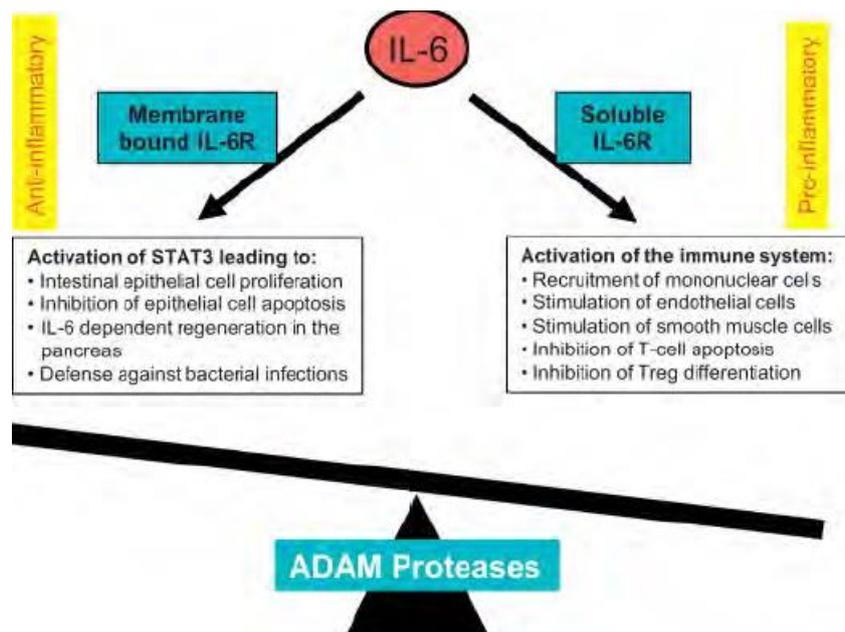


Figura 7. Propriedades pro e anti-inflamatórias da IL-6 (Adaptado de Scheller et al. (2011)).

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, à inibição da diferenciação das Tregs e à diferenciação de células Th17 (Scheller et al., 2011; Scheller, Garbers, & Rose-John, 2014).

2.2.3.1.5 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 infeção. As propriedades biológicas da família da IL-1 são tipicamente pro-inflamatórias (van de Veerdonk & Netea, 2013). A família da IL-1 tem 11 membros, incluindo as proteínas pro-inflamatórias IL-1 α e IL-1 β , o recetor antagonista da IL-1, a IL-1Ra, a IL-18 e a IL-33 (Arosa et al., 2012). A IL-1 β , tem, a nível de resposta inflamatória uma ação privilegiada, pelos seus efeitos claramente pro-inflamatórios (Dinarello, 2011).

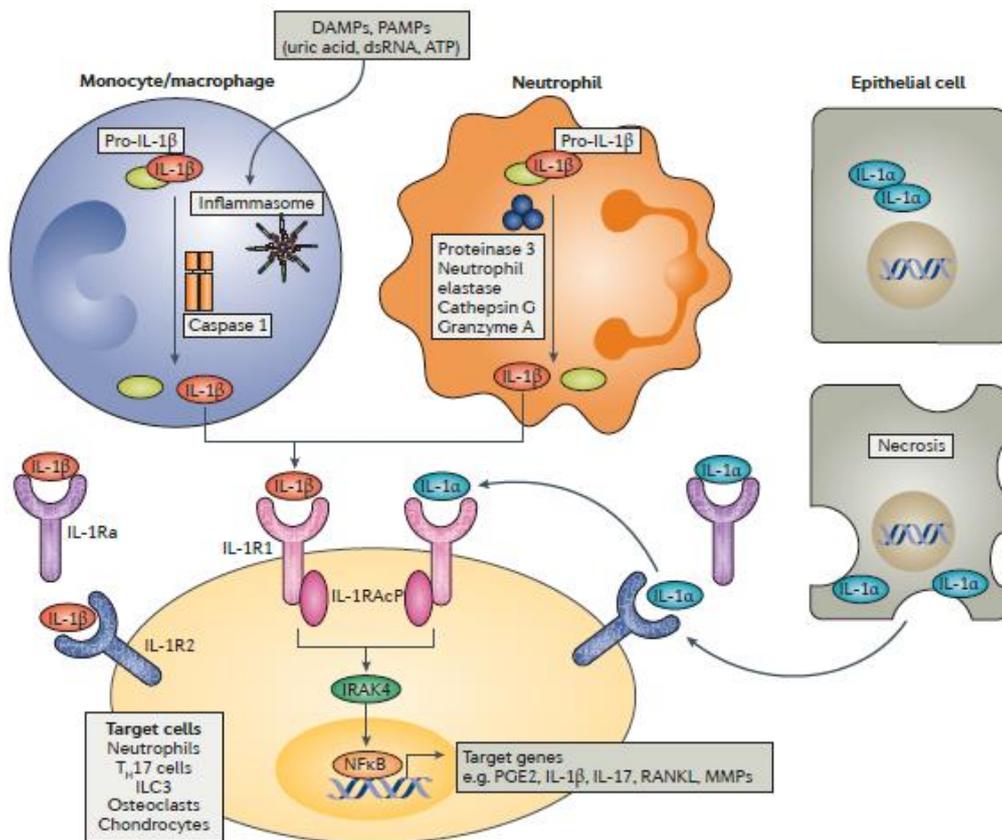


Figura 8. Ativação e sinalização do recetor da IL-1 (Adaptado de (Schett, Dayer, & Manger, 2016)).

A libertação de IL-1 β de monócitos / macrófagos e neutrófilos exige transformação enzimática da sua proteína precursora intracelular (pro-IL-1 β). Este passo pode ocorrer por duas vias diferentes. O precursor de IL-1 β , ou seja, pró-IL-1 β , 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 β extracelular. IL-1ra e o recetor solúvel do tipo 2 da IL-1 (IL-1R2) são reguladores negativos da via da IL-1 (Schett et al., 2016).

A família da IL-1 inclui dois recetores antagonistas, IL-1ra e IL-36ra (Dinarello et al., 2010). IL-1ra está presente no soro em concentrações muito mais elevadas do que a IL-1 β , 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).

A IL-1 interage a nível do sistema nervoso central e contribui para os sintomas da resposta de fase aguda da inflamação: letargia, febre, sono e anorexia. A sua interação com o hepatócito inibe a produção de proteínas *housekeeping* (e.g. albumina), e estimula a síntese de proteínas de fase aguda (e.g. a proteína C reativa e frações do complemento). A modulação dos efeitos potencialmente deletérios da IL-1 no curso natural da inflamação está muito ligada ao IL-1ra, secretado naturalmente em processos inflamatórios (Arosa et al., 2012).

2.2.3.1.6 INTERLEUCINA 10

Os membros da família da IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, e IL-29), partilham alguma homologia com interferões e seus recetores, mas em contraste com a IL-10 não tem capacidade anti-inflamatória, sendo-lhes reconhecida uma intervenção positiva na resposta inflamatória em geral (Arosa et al., 2012).

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+ (Fujio, Okamura, & Yamamoto, 2010; Saraiva & O'Garra, 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, 2012; Fujio et al., 2010; Gleeson et al., 2011). IL-10 afeta muitas funções importantes dos monócitos, macrófagos e DCs, desde a fagocitose, à produção de citocinas para a expressão de coestimuladores e o processamento e apresentação de antígenos. Também inibe a expressão de moléculas

de MHC, da ICAM-1 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- β , e moléculas do MHC classe II tais como a HLA-G (Gregori 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 à 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).

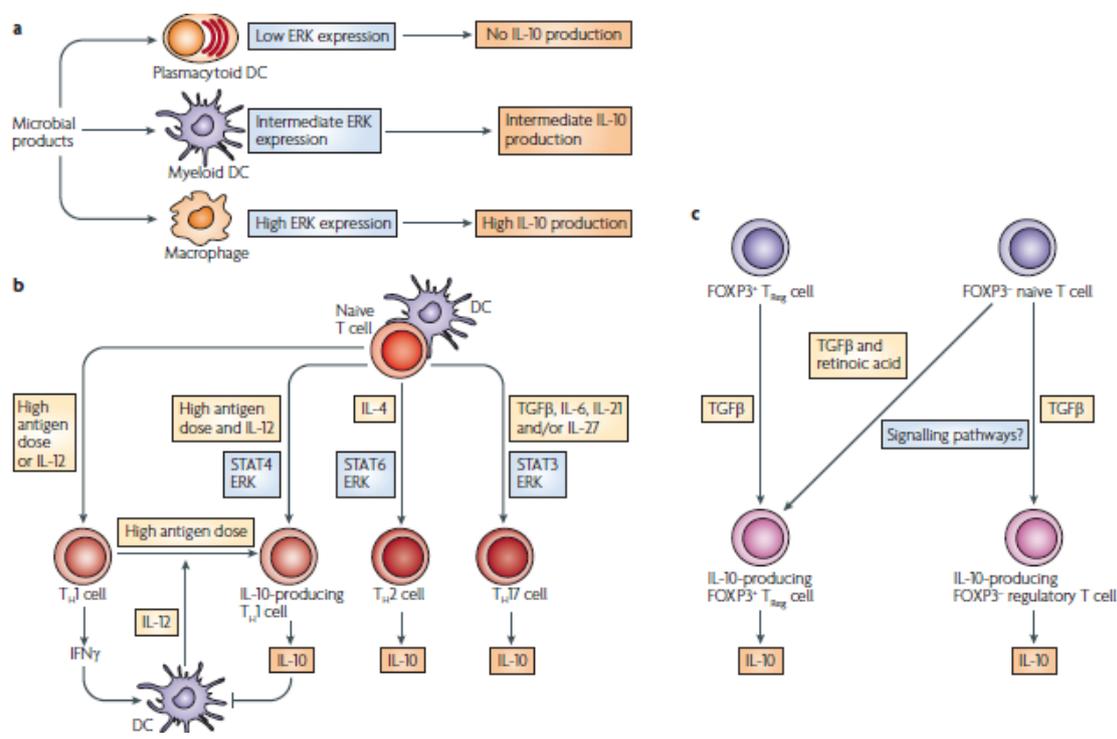


Figura 9. Expressão da IL-10 no Sistema Imunitário

(Adaptado de Saraiva and O'Garra (2010)).

E é da seguinte forma como é possível explicar a citocina IL-10: 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⁺ 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- γ . 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- β , IL-6, IL-21 e / ou IL-27 e sinalização STAT3 são suscetíveis de estar envolvidas. c) TGF- β pode induzir a produção de IL-10 por células T FoxP3⁺ e esta citocina pode também promover o desenvolvimento de células T FoxP3⁻ produtoras de IL-10 a partir de células T naïve. Por outro lado, células T FOXP3⁺ produtoras de IL-10 podem diferenciar de células T naïve in vitro, na presença de TGF- β e ácido retinóico (Saraiva & O'Garra, 2010).

2.2.3.1.7 INTERLEUCINA 15

A IL-15 foi inicialmente identificada como uma citocina sintetizada por células infetadas por virus e que estimulava a proliferação de células T. Tem semelhanças biológicas e estruturais como a IL-2, e tal como a IL-2, estimula a proliferação de células CD4 e CD8. Liga-se a um recetor heterodinamérico igual nas cadeias β e γ ao recetor IL-2 (IL-2R), mas diferente na cadeia α (Arosa et al., 2012).

Esta citocina desempenha um papel importante na diferenciação das células NK, linfócitos intraepiteliais intestinais e células T NK1⁺. Isto sugere que a IL-15 tem um papel importante na resposta inflamatória das mucosas, como, e.g. na doença inflamatória intestinal e na colite. No entanto, as funções biológicas de IL-15 não estão restritas apenas a estas patologias, já que outros estudos têm demonstrado que essa citocina é um potente fator quimiotático para células T e neutrófilos dos tipos celulares envolvidos numa grande variedade de respostas inflamatórias. De acordo com estes mecanismos efectores, a IL-15 tem sido associada à fisiopatologia de distúrbios de imunidade como a psoríase, esclerose múltipla e artrite reumatoide (Arosa et al., 2012).

2.2.3.2 CITOCINAS E EXERCÍCIO

O exercício e os stressores ambientais induzem um aumento na concentração sistêmica e nos níveis musculares de inúmeras citocinas. É interessante notar que a função de muitas dessas citocinas não é totalmente compreendida. Pesquisas adicionais são necessárias para aumentar nossa compreensão do papel biológico do exercício e da liberação de citocinas também induzida pelo ambiente.

Existe uma variabilidade individual considerável na magnitude das mudanças nas citocinas plasmáticas após o exercício (Peake 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, IL1-ra, fator estimulador de colónias granulocitárias (G-CSF), e provoca aumentos mais modestos no TNF- α , proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), IL-1 β , fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), IL-12p35/p40 e IL-15 (Peake et al., 2015).

No caso da IL-6, ela é também produzida pelo músculo após corrida prolongada, produzindo um 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 aeróbio (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 dos níveis de TNF- α estimulada por endotoxina são os mecanismos clássicos dessa relação (Gleeson 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 et al., 2015). A expressão de mRNA das citocinas IL-1 β , IL-1ra, IL-8 e IL-10 nos leucócitos aumenta após o exercício, enquanto que a expressão de mRNA da IL-6 permanece inalterada. 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- α) e de citocinas Th2 (IL-6, IL-10) após estimulação com fito-hemaglutinina aumentava após o exercício (Kakanis 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, & Simpson, 2013).

2.2.3.3 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, Chou, & Fang, 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 ligada à proteína. 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, & Sculthorpe, 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 imunitário (incluindo TNF- α e IL-1 β) (Allgrove, Gomes, Hough, & Gleeson, 2008). Esta hormona tem sido utilizada no campo do treino, como um dos marcadores preferenciais do stresse induzido pela carga de treino. Sugeriu-se que os níveis de cortisol aumentam em proporção com a intensidade do exercício, mas o limite da atividade secretora é também dependente da duração do exercício. Uma "intensidade limiar" de $\geq 60\%$ do VO₂max 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 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).

2.2.3.4 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 et al., 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 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, Baker, & Grace, 2014), a testosterona salivar é amplamente utilizada nos estudos com atletas jovens (Kilian et al., 2016), atletas de judo (Papacosta, Nassis, & Gleeson, 2016), futebol (Arruda et al., 2015), rugby (Gaviglio, Osborne, Kelly, Kilduff, & Cook, 2015), basquetebol (Miloski et al., 2015) e indivíduos idosos treinados ou não (Hayes et al., 2015).

2.2.3.5 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, & Agape, 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 et al., 1993; Vervoorn 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 et al., 1991).

2.2.3.6 *sCD14*

CD14 é o receptor de ligação ao LPS que apresenta o LPS ao seu complexo receptor de sinalização, MD-2/TLR4. O CD14 solúvel (*sCD14*) se liga prontamente aos monómeros LPS dos complexos LPS-LBP, e o *sCD14* pode participar da ativação celular transferindo LPS monomérico para *mCD14* ou transferindo o LPS diretamente para o complexo receptor MD-2/TLR4 em células que não expressam *mCD14* (Frey et al., 1992; Pugin et al., 1993). A capacidade de *sCD14* para inibir respostas a LPS recebeu relativamente pouca atenção. Embora os primeiros relatos tenham mostrado que *sCD14* é um inibidor de LPS (Haziot, Rong, Lin, Silver, & Goyert, 1995), geralmente se pensou que tinha pouca relevância fisiológica como mecanismo para controlar a resposta de LPS. No entanto, foi mostrado que no ambiente fisiológico do sangue total ou do soro humano não diluído, que a faixa de concentrações de *sCD14* encontradas em humanos normais e sépticos pode diminuir significativamente as respostas ao LPS.⁷ O *sCD14* pode remover ou desviar o LPS do *mCD14* e transferi-lo para lipoproteínas plasmáticas. O LPS move-se rapidamente entre *mCD14* e *sCD14* para que um equilíbrio seja estabelecido entre LPS-*mCD14* e LPS-*sCD14* (Hailman et al., 1996; Kitchens, Wolfbauer, Albers, & Munford, 1999). Se as lipoproteínas plasmáticas estiverem presentes, elas fornecem um mecanismo que remove progressivamente o LPS de *mCD14* e *sCD14*.

Como o efluxo de LPS ligado às células para as lipoproteínas plasmáticas atenua as respostas celulares? A apresentação do LPS ligado ao mCD14 ao receptor de sinalização MD-2/TLR4 deve ocorrer durante um período de tempo prolongado para produzir uma resposta máxima ou prolongada (Kitchens, Thompson, Viriyakosol, O'Keefe, & Munford, 2001; Kitchens et al., 1999). Embora o LPS se ligue ao mCD14 mais rapidamente do que às lipoproteínas, a presença de sCD14 e lipoproteínas plasmáticas faz com que o LPS se ligue transitoriamente aos monócitos no ambiente fisiológico do soro humano não diluído (Kitchens et al., 2001). Os níveis de sCD14 aumentam durante a inflamação aguda e a sepse, e isso aumenta o efluxo de LPS do mCD14 nos monócitos. O aumento do efluxo de LPS causa uma associação de LPS diminuída, ou muito mais transitória, com as células. Mesmo as concentrações normais de sCD14 têm um efeito supressor, pois descobriu-se que as respostas celulares nesses ensaios foram aumentadas pela imunodepleção de sCD14 do soro normal (Kitchens & Thompson, 2005; Kitchens et al., 2001; Kitchens et al., 1999).

Outros relataram efeitos inibitórios de sCD14 no plasma de pacientes humanos. Embora níveis elevados de sCD14 estejam associados a alta mortalidade em choque séptico Gram-negativo em humanos (Landmann et al., 1995), não há evidência direta de que o sCD14 seja deletério in vivo (Landmann, Reber, Sansano, & Zimmerli, 1996); pode ser apenas um indicador de gravidade da infecção, como também foi observado em pacientes com sepse Gram-positiva (Burgmann et al., 1996).

Experimentos in vivo em ratinhos confirmam que o aumento dos níveis de sCD14 pode ajudar a controlar as respostas ao LPS. Dois estudos independentes mostraram que a administração de sCD14 recombinante humano em ratinhos pode resgatar os animais dos efeitos letais do LPS mesmo quando administrado até 30 min após o LPS (Stelter et al., 1998). A expressão induzível de um transgene CD14 murino em tecidos não mieloides de ratinhos também resgataram os animais da letalidade do LPS em ratinhos infectados com *Propionibacterium acnes* e na reação letal generalizada de Shwartzman (Tamura et al., 1999).

A expressão de qualquer um dos dois transgenes CD14 (com ou sem a sequência de sinal âncora GPI) levou a níveis circulantes elevados de sCD14 (Tamura et al., 1999), o que presumivelmente contribuiu para a diminuição dos níveis séricos de citocinas e diminuição do dano hepático em ratinhos infectados com *P. acnes*.

Os monocitos podem dividir-se em duas populações, células clássicas (CD14⁺⁺) e inflamatórias (CD14⁺), cuja diferença reside na forma como expressam o receptor de superfície celular. É importante mencionar que os CD14⁺ (inflamatórios), têm o dobro dos receptores que os CD14⁺⁺ (clássicos) (Skinner, MacIsaac, Hamilton, & Visvanathan, 2005). Os monócitos CD14⁺ representam apenas 10% da sua população total, mas têm um potencial inflamatório significativo dentro do grupo de monocitos totais (Belge et al., 2002).

Existe evidência de um aumento temporal na percentagem de monócitos inflamatórios após uma sessão de exercício intenso, com um regresso rápido aos níveis iniciais durante a recuperação. O cortisol pode estar envolvido na redução do número de monócitos CD14⁺CD16⁺ com o treino físico (Fingerle-Rowson, Angstwurm, Andreesen, & Ziegler-Heitbrock, 1998). Vários estudos demonstraram que o treino de alta intensidade

tem como resultado um aumento no número de células T reguladoras e a activação também se associou a uma expressão reduzida de citocinas pro-inflamatórias (Wang, Hu, Fan, Zhou, & Zhong, 2012).



METODOLOGIA

Antes do início da recolha dos dados, todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, e os procedimentos utilizados respeitaram as normas internacionais de experimentação com seres humanos (Manzini, 2000). Este projeto contempla ainda, a colaboração de profissionais de distintas áreas das Ciências da Saúde, além de cooperação internacional, desde a sua concepção inicial.

3.1. PARTICIPANTES

A amostra utilizada neste estudo foi composta por atletas de running de diferentes especialidades e que competem a nível nacional em Portugal. O presente trabalho começou a ser realizado com a participação de 11 atletas de alto rendimento, do sexo masculino, residentes da cidade de Coimbra, Portugal, federados na modalidade de atletismo, com um mínimo de 7 anos de experiência na modalidade e que participavam regularmente em provas do programa regional e nacional. Para o seu recrutamento foi apresentado um convite para participar no trabalho de investigação aos grupos de atletismo da cidade, também foi feito o convite a alguns atletas conhecidos pelos investigadores, onde se explicava detalhadamente o que era pretendido fazer. Foi feito o recrutamento inicial das pessoas que mostraram interesse em participar. Os atletas que cumpriam os requisitos de elegibilidade visitaram o Laboratório Integrado da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra. Durante este primeiro dia, com a colaboração dos professores orientadores e de uma segunda estudante pesquisadora, foi explicado o trabalho e os objetivos, foram aclaradas quaisquer dúvidas pessoalmente e foi-lhes entregue o consentimento informado para levar e lerem em suas casas, para depois, se não houvesse dúvidas e concordassem com tudo o que ali estava mencionado, devolverem assinado aos pesquisadores. Durante o trabalho ocorreram três desistências, ficando a amostra final com um total de oito participantes.

A caracterização dos participantes é apresentada no capítulo dos resultados, na tabela 4.1.

3.2. CRITERIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os voluntários foram autorizados a participar no projeto de investigação se atendessem aos seguintes requisitos: a) ser atleta masculino; b) ter idade > de 18 e < de 50 anos; c) ter um $VO_2\text{máx} > 55 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, valor considerado adequado para um atleta de running competitivo (Munguía-Izquierdo & Legaz-Arrese, 2006); d) os atletas deviam estar fisicamente ativos pelo menos desde quatro meses antes do começo do estudo; e) não ter deixado os treinos durante mais de seis meses em qualquer momento do seu histórico como atletas; f) estar dispostos em não participar em competições durante o processo de aclimação; g) não ter nenhuma lesão; h) serem federados na modalidade de atletismo. Não foi permitida a participação de sujeitos que:

- a) sofreram de qualquer doença inflamatória crónica ou estiveram em tratamento com anti-inflamatórios por qualquer razão;
- b) sofreram de distúrbios gastrointestinais, cirurgia gastrointestinal ou abdominal, um problema de deglutição, felineização do esôfago, refluxo, diabetes, doença hepática ou outra doença crónica (Kalach, Rocchiccioli, de Boissieu, Benhamou, & Dupont, 2001);
- c) possuir pace-maker e/ou outro dispositivo eletromédico implantado;
- d) ser fumadores.

Com o objetivo de obter esta informação, foi passado aos atletas um inquérito de auto-reporte. Este documento foi feito pelos pesquisadores diretamente para este trabalho.

3.3. DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo de desenho quase-experimental, em que os participantes foram avaliados em vários parâmetros antropométricos, fisiológicos e bioquímicos em oito momentos, em quatro dias diferentes. Tanto as avaliações fisiológicas quanto as recolhas das amostras de sangue e saliva necessárias para a avaliação dos parâmetros bioquímicos, foram sempre feitas à mesma hora do dia nos diferentes dias, isto devido à natureza circadiana de alguns biomarcadores (Domínguez-Rodríguez et al., 2003).

Basados em evidencia, foi criado um protocolo no qual fosse possível medir as variáveis de desempenho e fisiológicas em intensidades moderadas e altas, isto devido as diferenças que a intensidade provoca nas respostas dessas variáveis (Amaro-Gahete et al., 2019; Grant et al., 2002). Em concordância com estudos anteriores e com informação já conhecida, os valores de 2 mmol/L e 4 mmol/L de LA foram determinadas como equivalências a uma intensidade moderada ou alta respectivamente (Bircher, Knechtle, & Knecht, 2005; Castagna, Impellizzeri, Chaouachi, Bordon, & Manzi, 2011; Grant et al., 2002). Como vai ser explicado no ponto 3.4.1. deste trabalho, entre cada patamar do teste experimental de corrida até a exaustão, foi dada uma paragem de um minuto para as avaliações de algumas das variáveis fisiológicas -consideradas para o estudo-, entre elas tomada em consideração o LA. Para a avaliação da intensidade da prova nos atletas, foram consideradas diferentes variáveis tais como a RPE, HR e também o LA, mas por evidencia previa (Grant et al., 2002), foi eleito o LA como aquela a ser usada como a melhor opção (a “gold standard”) na hora de elegir o momento em que era alcançada a intensidade no teste de corrida. Para a avaliação da intensidade por meio de LA, era colhida uma amostra de sangue capilar da polpa do dedo com o objetivo de avaliar a sua concentração para esse momento em específico do teste de corrida. Cada medição da

concentração de lactato foi realizada com um mini espectrofotômetro Dr. Lange®, conforme as indicações do fabricante. No primeiro momento em que o atleta saísse com valores iguais ou maiores de 2 mmol/L no resultado do LA, eram então determinados os dados obtidos nesse momento como os resultados dos atletas numa intensidade moderada e para o momento em que ocorresse o mesmo mas para valores iguais ou superiores a 4 mmol/L no resultado do LA, eram então determinados como os resultados dos atletas para uma intensidade alta.

O protocolo de exercício físico, assim como a combinação com a intervenção de aclimação, foi a estratégia utilizada para estudar a alteração da resposta destas variáveis nos atletas. Os protocolos de exercício e as intervenções utilizadas serão explicadas posteriormente nos pontos 4.5 e 4.6. respectivamente.

3.3.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental é apresentado a seguir nas figuras 10 e 11. A figura 11 é detalhada de acordo com o formato estabelecido por Campbell and Stanley (1963), segundo os protocolos estabelecidos pelos investigadores.

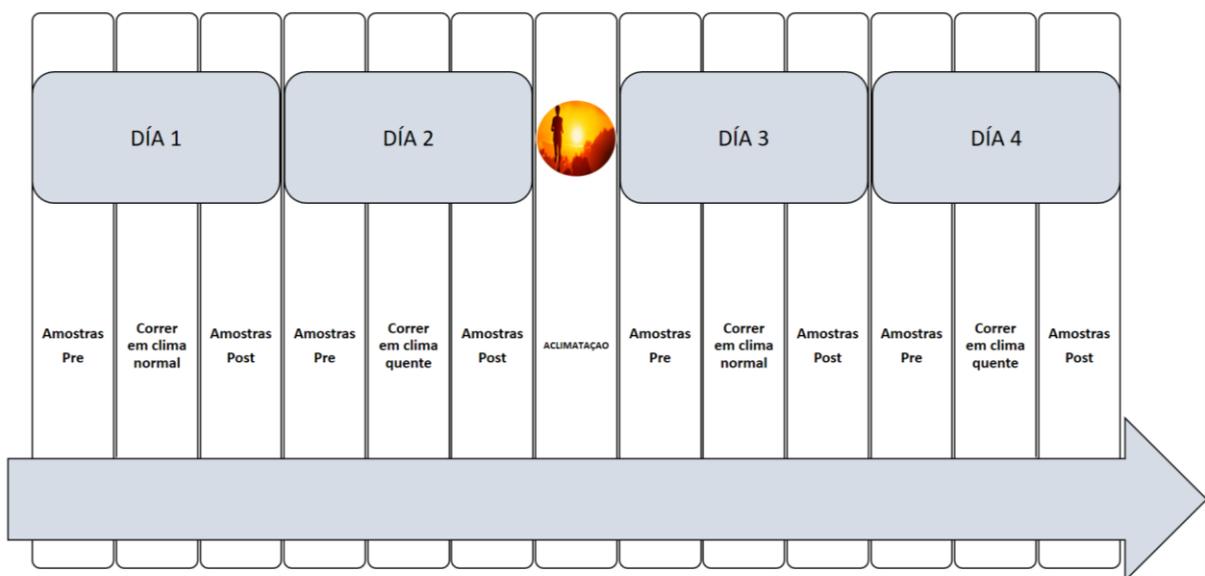


Figura 10. Protocolo experimental.

O₁ O₂ X O₃ O₄

Figura 11. Desenho experimental segundo o formato de Campbell and Stanley (1970).

O₁ = Pré-teste das variáveis fisiológicas durante e depois do teste experimental de esforço máximo (intervenção física), e colheita de amostras de sangue e saliva antes e depois do mesmo teste para a posterior avaliação das variáveis bioquímicas no laboratório. Os sujeitos correram o teste experimental de esforço máximo no laboratório em condições de clima normal.

O₂ = Pré-teste das variáveis fisiológicas durante e depois do teste experimental de esforço máximo (intervenção física), e colheita de amostras de sangue e saliva antes e depois do mesmo teste para a posterior avaliação das variáveis bioquímicas no laboratório. Os sujeitos correram o teste experimental de esforço máximo no laboratório em condições de clima de stresse por calor.

O₃ = Pós-teste das variáveis fisiológicas durante e depois do teste experimental de esforço máximo (intervenção física), e colheita de amostras de sangue e saliva antes e depois do mesmo teste para a posterior avaliação das variáveis bioquímicas no laboratório. Os sujeitos correram o teste experimental de esforço máximo no laboratório em condições de clima normal.

O₄ = Pós-teste das variáveis fisiológicas durante e depois do teste experimental de esforço máximo (intervenção física), e colheita de amostras de sangue e saliva antes e depois do mesmo teste para a posterior avaliação das variáveis bioquímicas no laboratório. Os

sujeitos correram o teste experimental de esforço máximo no laboratório em condições de clima de stresse por calor.

X = Intervenção do tratamento/protocolo de aclimação.

3.3.2. AVALIAÇÕES PRELIMINARES

Após o recrutamento inicial dos participantes, aqueles atletas que atendiam os requisitos, num primeiro momento visitaram o Laboratório Integrado da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física (FCDEF) da Universidade de Coimbra para serem avaliados antropometricamente. Para obter os valores destas medidas os sujeitos visitaram este laboratório em condições de jejum e foi utilizada a pletismografia por ar (BOD POD®), modelo BOD POD 2006). Depois disso, receberam um pequeno almoço standard e foram solicitados a preencher dois formulários, um sobre seu histórico de saúde e outro sobre o seu histórico desportivo.

Dois dias depois, já no laboratório de Energia, Ambiente e Conforto da Associação para o Desenvolvimento da Aerodinâmica Industrial (ADAI), da Universidade de Coimbra, foi realizado um teste de $VO_{2\text{máx}}$ aos atletas. Com o objetivo de eliminar efeitos residuais do treino ou competição, estas avaliações foram realizadas respeitando no mínimo 48 horas de recuperação desde a última sessão de exercício. Todos os procedimentos foram realizados no início da época desportiva dos atletas. O $VO_{2\text{máx}}$, foi avaliado por meio de um teste progressivo por patamares sobre um tapete rolante (HP COSMOS Quasar®), onde os gases expirados foram medidos por meio de um analisador de gases METAMAX® (Cortex Leipzig, Germany). Os sensores de O_2 e CO_2 foram calibrados com gases de concentração conhecida de O_2 , N_2 e CO_2 antes de cada teste. Os

sensores de fluxo também foram calibrados antes de cada teste com uma seringa de 3 litros. Os critérios para a interrupção do teste de determinação do $VO_{2\text{máx}}$ foram:

- a) desejo do participante em terminar a prova;
- b) um RER 1,15;
- c) um plateau na curva de $VO_2 < 2 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, com aumento da carga de trabalho.
- d) atingir a FC máxima previamente determinada.
- e) atingir uma concentração de ácido láctico superior a 8mmol/l.

Durante o teste, a frequência cardíaca máxima ($FC_{\text{máx}}$), foi obtida assumindo o maior valor da FC registrado no último patamar do teste. Imediatamente após o final do teste de esforço, foi colhida uma amostra capilar de sangue da polpa do dedo com o objetivo de avaliar a concentração de lactato ($Lac_{\text{máx}}$). A medição da concentração de lactato foi realizada no mini espectrofotômetro Dr. Lange®, conforme as indicações do fabricante.

No final do último patamar do teste, os atletas foram convidados a identificar numa tabela fixada na parede em frente ao tapete rolante, o esforço percebido (RPE), através da utilização da escala de Borg (Borg, 1998). Isto foi feito para confirmar que o esforço máximo dos atletas tinha sido alcançado na prova.

3.3.3. METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DO DISPÊNDIO ENERGÉTICO

O dispêndio energético foi medido de forma contínua por meio de calorimetria indireta com um analisador de gases respiratórios. A taxa metabólica foi calculada pelo

método de Weir (1949), a partir do consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono ($\text{Dispêndio energético (kcal/min)} = 3.94 \times \text{VO}_2 \text{ (mL/min)} + 1.106 \times \text{VCO}_2$).

3.3.4. METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA PERCENTAGEM DE DESHIDRATAÇÃO

A análise do estado de desidratação foi calculada como uma percentagem do peso corporal perdido. A fórmula utilizada foi a seguinte = $(100/\text{Peso inicial}) \times (\text{Peso inicial} - \text{Peso final})$. Para o cálculo do peso final foi retirado o líquido ingerido pelos atletas durante o teste experimental de corrida até a exaustão.

3.3.5. COLHEITA DE SANGUE

O sangue venoso (20 ml) foi colhido de cada participante da veia antecubital, por punção venosa e na posição sentada. Esta recolha foi realizada por um enfermeiro experiente e foi colhido sempre no mesmo horário do dia para cada atleta, nos momentos pre-exercício e pós-exercício dos quatro dias de avaliação, de acordo com os procedimentos padrão. Para o armazenamento de sangue, foram usados vacutainers de Plasma (EDTA) e Soro, da Becton Dickinson® (Franklin Lakes, NJ, EUA) e transportados numa arca térmica com sacos de gelo e compressas de gel frio até ao Laboratório Integrado da FCDEF da UC.

Os tubos de EDTA foram utilizados para o hemograma e separação do plasma. Para a realização do hemograma foi utilizado o equipamento “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 os valores de hemoglobina (Hb) e hematócrito (Hct). As mudanças no volume plasmático foram estimadas a partir de mudanças no conteúdo de Hb e Hct do sangue total nos tubos de EDTA imediatamente após a coleta da amostra. As

concentrações de Hb e Hct no sangue total foram usadas para calcular as variações de volume plasmático após o exercício de acordo com a metodologia descrita por Dill e Costill: $\% VP = Hb1/Hb2 \times ((100 - Hct2)/(100 - Hct1)) - 1 \times 100$ (Dill & Costill, 1974). As amostras de sangue nos tubos de EDTA e Soro foram centrifugadas durante 15 minutos a 4°C e 2000 rpm. Após centrifugação, o plasma e o soro foram armazenados em eppendorfs e colocados na arca congeladora a -80°C até serem utilizados para as avaliações das concentrações das citocinas e da endotoxina.

A colheita de amostras biológicas foi levada a cabo sempre no laboratório da Associação para o Desenvolvimento da Aerodinâmica Industrial (ADAI) da Universidade de Coimbra. As colheitas de sangue foram sempre realizadas após 10min de descanso sentado dos atletas. A estes foi pedido que nos quatro dias das avaliações visitassem o laboratório de Energia, Ambiente e Conforto da ADAI sempre à mesma hora do dia, pois iam ser avaliadas variáveis que tem as suas funções em sintonia com alguns ritmos circadianos.

3.3.6. COLHEITA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SALIVA

A saliva foi colhida durante dois minutos consecutivos diretamente num tubo adequado para isso. As amostras de saliva foram colhidas durante os quatro dias de avaliações, seguindo o mesmo cronograma das colheitas de sangue no início das provas (pré-teste) e no fim (pós-teste). Pela natureza circadiana de alguns biomarcadores, a recolha de saliva também foi sempre realizada à mesma hora do dia. A avaliação dos níveis salivares de testosterona e cortisol foi feita através de ensaio de ELISA competitivo em kits comercialmente disponíveis (Salimetrics, Strathagene®, UK) e de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS E ENDOTOXINA

Os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-15, IL-10, TNF- α , (Invitrogen, Thermofisher, UK), e sCD14 (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands), foram determinados por ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), seguindo as instruções dos fabricantes.

3.3.8. WBGT (WET BULB GLOBE TEMPERATURE)

Para realizar a avaliação do ambiente térmico foi usado o transdutor WBGT. O mesmo consiste em três elementos de detecção de temperatura de resistência separados de acordo com os requisitos 7243 7243 ISO (1989). Para a segurança dos atletas foi tomado em consideração o índice WBGT, inicialmente proposto por Yaglou and Minaed (1957), e depois adotado pelo NIOSH (1972) e pela ISO como um padrão internacional (7243 ISO, 1989). calculado com pelo menos dois dos seguintes parâmetros ambientais: a temperatura húmida, a temperatura do balão e a temperatura seca. O método WBGT apresenta as seguintes vantagens: a) permite a avaliação do ambiente por meio de um único valor; b) requer equipamento simples; c) o método de cálculo é fácil; d) pode ser utilizado em ambientes internos e externos; entre outros (Cújar-Vertel & Julio-Espitia, 2016). Existem diferentes equações para determinar o valor deste índice, dependendo se vai ser usado no interior, em lugares sem radiação solar ou no exterior (ao ar livre) onde exista radiação solar, pois nesta segunda condição a equação muda para o cálculo; a equação usada para o cálculo foi a seguinte: $0.7*THN$ (Temperatura Úmida Natural) + $0.3*TG$ (Temperatura do Globo) (Mendaza, 1993).

3.4. INTERVENÇÃO DE EXERCÍCIO FÍSICO

Para esta parte do estudo, os participantes foram orientados a visitar o laboratório da ADAI.

Adicionalmente foi explicado que, esta intervenção de exercício físico tinha que ser realizada quatro vezes, e que para cumprir os objectivos do trabalho, eles iriam realizar duas sessões antes da aclimatação e as outras duas sessões depois da aclimatação.

Com o objectivo de eliminar efeitos residuais de qualquer treino ou competição, estas intervenções foram realizadas respeitando no mínimo 48 horas de recuperação da última sessão de exercício ou treino que tiveram realizado. Cumprindo isto, cada participante visitou o laboratório para completar o teste experimental de esforço máximo por patamares em condições controladas de humidade e temperatura (teste desenhado pelo professor e coorientador deste trabalho, o Doutor Amândio Cupido Santos), que consistiu em correr num tapete rolante com 0% de inclinação, por um tempo mínimo de 34 minutos. Como vai ser explicado a seguir, a intensidade da corrida aumentaria progressivamente e iria ser um teste até à exaustão. Durante este tempo eram feitas alterações na intensidade através da velocidade de corrida.

3.4.1. PROTOCOLO DETALHADO DO TESTE EXPERIMENTAL DE CORRIDA ATÉ A EXAUSTÃO

- Fase 1 – O atleta era colocado dentro da câmara climática por 7 minutos, exposto às condições climáticas do teste a realizar, sendo de seguida realizadas a colheita de sangue para a medição do hematócrito e a medição da pressão arterial;

- Fase 2 – O atleta era colocado na passadeira rolante para proceder a um aquecimento de 10 minutos a 9km/h;

- Fase 3 – Após calibrar os valores do MetaMax (figura 3-6) e assegurar a correta leitura dos dados (VO₂, VE e QR), era dado início ao teste, contando com 4 minutos de corrida a 10km/h (1º patamar), depois 4 min a 12 km/h e depois com um aumento na velocidade de corrida de 1 km/h para cada um dos patamares seguintes, ocorrendo sempre uma paragem de um minuto entre patamares como forma de medição das variáveis FC, LA, TA, VO₂, VE, QR e RPE. Estes patamares continuaram até atingir a exaustão ou o atleta solicitar a interrupção.

- Fase 4 – No momento de término do esforço do atleta, eram recolhidos os dados fisiológicos relativos ao patamar realizado e o atleta era colocado a andar a uma velocidade de 5km/h durante 5 minutos.

De seguida o atleta foi encaminhado para a casa de banho para recolher a amostra de urina. Após urinar e avaliar a temperatura da urina, encaminhava-se para a câmara onde era avaliada a massa corporal e onde dava início aos 7 minutos de repouso pós-esforço, onde era analisado posteriormente os parâmetros do hematócrito e TA. É de notar que desde o final do esforço até ao momento em que eram feitas as últimas medições o atleta não podia ingerir líquidos.

Durante estas avaliações os atletas usaram um cardiofrequencímetro marca Polar® modelo V800, para ter um controlo da sua frequência cardíaca e monitorização de risco para a saúde.

3.5. INTERVENÇÃO CLIMÁTICA (TESTE MÁXIMO REALIZADO SOBRE STRESS TÉRMICO)

Para cumprir com as condições ambientais clássicas de climatério de laboratório (21°C e 35% de humidade relativa) e as condições ambientais de stresse térmico (clima

quente), semelhantes às esperadas na cidade de Tóquio durante os meses dos jogos olímpicos 2020 (34°C e 60% de humidade relativa), foi usado o equipamento de medição para avaliação de ambientes (Estação Multisondas para Avaliação de Climas Interiores da Brüel & Kjær® e o Sistema de Medição do Índice WBGT – Heat Stress Monitor tipo 1219 com três conjuntos de sondas (bulbo úmido natural, globo de 150mm e Heat Stress Monitor tipo 1219) da Testo®) do Laboratório de Aerodinâmica Industrial da ADAI - lugar onde foram feitos os testes e a aclimatação-. Os parâmetros físicos do ambiente foram medidos conforme 7726 ISO (1998). Essas medidas foram precedidas por um período de estabilização de 30 min. A velocidade do ar foi medida com uma frequência de 1/10 Hz com um sensor de esfera quente da Testo® (refª 0635 1049) ligado ao data logger Testo 445 (refª 0560 4450). Este data logger também foi conectado a um transdutor de umidade também da Testo® (refª 0636 9741).

A intervenção climática planeada pelos pesquisadores foi aplicada no segundo e no quarto momento de medição, dos quatro momentos totais.

3.6. ACLIMATAÇÃO

Foi criado um único protocolo de aclimatação para todos os participantes, pelo que todos realizaram as mesmas sessões de aclimatação e com o mesmo intervalo de tempo entre cada uma.

O protocolo de aclimatação desenvolvido contou com seis sessões de corrida contínua, cada sessão contou com uma duração de 40, 60, 80, 90, 100 e 100 minutos segundo o ordem de aplicação respectivamente, a uma intensidade de 60% do seu $VO_{2\text{máx}}$, a uma temperatura de 34°C e com uma humidade relativa de 55%. As sessões de aclimatação foram realizadas na câmara térmica localizada no laboratório de Energia, Ambiente e Conforto da Associação para o Desenvolvimento da Aerodinâmica Industrial

(ADAI), e foram aplicadas em dias não consecutivos (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira ou terça-feira, quinta-feira e sábado segundo fosse a melhor opção para o atleta), e com uma duração total de duas semanas. O facto de o protocolo ter sido realizado em dias não consecutivos, deu aos atletas a oportunidade de conciliar as sessões de aclimação com os treinos habituais (tomando em consideração as cargas e intensidades dos mesmos). Este protocolo de aclimação foi definido pela equipe de investigação de acordo com os resultados da revisão de literatura, das características físicas dos atletas e das solicitações dos próprios atletas e seus treinadores.

Foi ainda medido o índice de stresse térmico no laboratório (o instrumento utilizado foi o WBGT), para assegurar que não fosse perigoso realizar exercício nestas condições (Moran et al., 2001).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados com dois programas, o primeiro deles é o Statistical Discovery From SAS JMP® versão 15 e o segundo é o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®), versão 23.0 for Windows®.

Os dados são apresentados como médias (\bar{X}) e desvíos padrão (DP). A distribuição de cada variável foi examinada com a prova de normalidade de Shapiro–Wilk e a mesma foi escolhida devido ao tamanho da amostra ($n < 50$). A significância estatística foi estabelecida *a priori* em $p < 0.05$.

A normalidade dos dados foi testada considerando a resposta a duas condições:

- a) O valor p do teste de Shapiro-Wilk (foi escolhido pelo n da amostra), e
- b) A inspeção visual dos histogramas gerados.

Os dados foram estudados de diferentes formas de acordo com os objetivos do trabalho. As análises foram as seguintes:

- De acordo com o interesse em saber se a resposta das variáveis fisiológicas e imunológicas nos atletas após a intervenção de exercício físico em cada um dos ambientes era influenciada pela aclimação ao calor, foi analisado por meio da ANOVA de uma via de medidas repetidas (uma análise independente para as respostas em cada condição ambiental).
- Com o objetivo de conhecer e comparar o efeito agudo da intervenção do exercício nas variáveis tanto fisiológicas quanto imunológicas nos atletas durante cada um dos dias de medição, foi usado o ANOVA Factorial com medidas repetidas, com um desenho de 8 x 2 (medições x ambiente).

Para os testes ANOVA, foram realizados acompanhamentos apropriados e análises post-hoc quando necessários (i.e., se as interações fossem estatisticamente significativas/ testes de Bonferroni com ajuste para comparações múltiplas).

Como análises complementares para melhor compreensão e possibilidade de aplicabilidade prática dos resultados, foram realizados cálculos de percentagens de variância e tamanhos de efeito (Cohen, 1988), dados que foram incluídos nas tabelas de resultados tanto para as variáveis fisiológicas (ver tabela 5), quanto para as variáveis bioquímicas, imunológicas e endotóxicas (ver tabela 6).

RESULTADOS

Os resultados mais importantes deste trabalho são apresentados a seguir, sendo primeiro apresentadas as características dos participantes, seguindo-se as características ambientais dentro do laboratório, dos resultados das variáveis fisiológicas, dos resultados das variáveis bioquímicas, imunológicas e endotóxicas (plasmáticas e salivares), e do estado de hidratação. Em primeiro lugar serão apresentados os resultados das variáveis fisiológicas e depois os resultados das variáveis inflamatórias que serão exibidos por meio de tabelas e figuras. No início, as estatísticas descritivas das características dos sujeitos são apresentadas (ver Tabela 3), seguido das características do ambiente durante as provas, medições e características durante o protocolo de aclimatação (ver Tabela 4). Depois são apresentados os resultados das análises inferenciais, primeiro para as variáveis fisiológicas, depois, para as variáveis do estado de hidratação dos atletas e também para as dos indicadores bioquímicos. Em anexo encontra-se também a meta-análise desenvolvida no início do doutoramento, com o objetivo de definir o melhor desenho metodológico -dentro das possibilidades- para o projeto de tese.

4.1 CARACTERÍSTICAS DOS PARTICIPANTES

Oito atletas saudáveis participaram do estudo. Os participantes treinaram para provas de média e longa distância, como os 3000 metros e ultra trail de montanha (48 km). Em média, treinam mais de 10 horas semanais. Os valores de Hb e Hct encontravam-se dentro dos valores normais para homens adultos (Pagana & Pagana, 2003). A descrição da caracterização dos participantes é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos participantes.

Variável	$\bar{X} \pm DP$
Idade (anos)	37.5 ± 11.21
Estatura (cm)	175.85 ± 7.78
Peso corporal (kg)	69.22 ± 6.75
IMC (kg/m ²)	22.35 ± 1.35
Massa gorda (%)	13.76 ± 4.67
VO ₂ máx (ml • kg ⁻¹ • min ⁻¹)	64.55 ± 3.41
VO ₂ máx (L • min ⁻¹)	4.47 ± 0.41
Hb (mmol • L)	9.90 ± 0.71
Hct (%)	43.49 ± 3.56

$\bar{X} \pm DP$ = média ± desvio padrão. IMC = índice de massa corporal; VO₂máx = Consumo máximo de oxígeno; Hb = hemoglobina; Hct = Hematócrito.

4.2 AMBIENTE CLIMÁTICO NO LABORATÓRIO

O ambiente dentro do laboratório onde foram realizadas as medições e testes apresentou diferenças significativas entre o ambiente denominado *Condições Ambientais Clássicas de Climatério de Laboratório (N)* e o denominado *Condições Ambientais de Stresse Térmico (H)* (ver Tabela 4), tanto para as condições anteriores ao tratamento de aclimação quanto as posteriores ao mesmo e não foram encontradas diferenças entre as condições do ambiente nos momentos NS x NC e HS x HC. Os valores obtidos através do Índice WBGT, apresentaram condições de temperatura significativamente superiores para o ambiente H em relação as N ($p < 0.01$). O ambiente dentro do laboratório durante as sessões de aclimação foi de 28.48 ± 0.67 °C. Não foram encontradas diferenças significativas entre as sessões de aclimação nem entre os valores de nenhuma das sessões de aclimação para cada um dos sujeitos.

Tabela 4. Características do ambiente dentro do laboratório durante as provas e medições.

Momento Variável	NS	NC	HS	HC	HA
Í-WBGT	18.24 ± 1.29	18.25 ± 1.06	28.24 ± 1.50**	28.20 ± 0.27**	28.48 ± 0.67

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. NS: condições ambientais clássicas de climatério de laboratório sem aclimação ao calor; HS: condições ambientais de stresse térmico sem aclimação ao calor; NC: condições ambientais clássicas de climatério de laboratório com aclimação ao calor; HC: condições ambientais de stresse térmico com aclimação ao calor; HA: aclimação ao calor; Í-WBGT: Índice WBGT. ** = $p < 0.01$. NS vs HS; NC vs HC.

4.3 RESULTADOS DAS VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS

Os atletas no teste de corrida de pré-aclimação exerceram um esforço equivalente a $100.96 \pm 4.83\%$ do seu $VO_{2máx}$; enquanto no mesmo teste de corrida pós-aclimação o esforço foi de $100.23 \pm 5.54\%$ ($p = 0.286$). Os atletas apesar de não apresentarem diferenças significativas na velocidade ($p = 0.58$), através da interpretação do tamanho do efeito, é possível dizer que foi obtida uma pequena melhoria na sua velocidade após a HA para H e intensidade moderada (2mmol/l) ($ES = -0.2$). A FC vista como percentual da FC máxima (220-idade), não mostrou diferenças significativas entre nenhum dos momentos tanto antes como depois da aclimação ($p = 0.397$), mas, o tamanho do efeito encontrado (0.3), corresponde a um tamanho de efeito entre pequeno e médio, e foi encontrado para H a uma intensidade alta (4mmol/l). Ao analisar os resultados do $VO_{2máx}$, foram encontradas diferenças significativas ($p = 0,017$) entre as condições ambientais NC x HC na intensidade de 2mmol/l; para esta variável também foi possível observar um tamanho de efeito pequeno, na N em intensidade moderada ($ES = 0,2$). Não foram encontradas diferenças significativas para a VE ($p = 0,56$). Foi achado um tamanho de efeito pequeno nos 2mmol/l em condições N (0.2). O QR dos atletas apresentou valores muito semelhantes para todos os momentos de avaliação, não sendo encontradas diferenças significativas ($p = 0.85$) para esta variável. A tensão arterial sistólica dos atletas não

apresentou diferenças significativas ($p = 0.65$). Também, não foram encontradas diferenças significativas na tensão arterial diastólica (0.58), mas, sim foram encontrados alguns tamanhos de efeito para estas variáveis. Na tensão arterial sistólica foi possível ver um tamanho do efeito entre pequeno (-0.2), na condição N numa intensidade alta, assim como outros dois tamanhos de efeito entre pequenos e médios, para condições H na intensidade moderada (0.4) e também alta (0.3). Para a tensão arterial diastólica, foi identificado um tamanho de efeito médio (0.5), na condição N a 2mmol/l, um tamanho de efeito entre médio a grande, na condição H a 4 mmol/l (0.6), e também, dois tamanhos de efeito grandes (0.8), o primeiro na condição H a 2 mmol/l, e outro na condição N a 4mmol/l. Foram encontradas diferenças significativas no dispêndio energético total, ao comparar os momentos NC e HC a uma intensidade moderada ($p = 0.015$), sendo maior o dispêndio energético total na condição H. Não se verificou nenhuma outra diferença para esta variável desde a perspectiva das análises estatísticas inferenciais, mas, depois de estudar os cálculos dos tamanhos do efeito, foi possível identificar um tamanho de efeito entre médio e grande (0.6), para o momento em que os atletas se encontravam na condição N a uma intensidade de 2mmol/l, e outro tamanho de efeito entre pequeno e médio (0.4), para a condição H numa intensidade alta. Não foram encontradas diferenças significativas para o dispêndio energético aeróbio nem para o dispêndio energético anaeróbio, ($p = 0.185$; $p = 0.181$, respectivamente). Em relação aos tamanhos de efeito, para a variável dispêndio energético aeróbio, foram encontrados tamanhos de efeito que se encontram, entre os valores médio e grande, para a condição H a 2mmol/l (0.6) e 4mmol/l (-0.7). Foram encontrados valores idênticos mas com sinal oposto nos tamanhos de efeito para o dispêndio energético anaeróbio, (-0.6), na intensidade moderada e (0.7), na intensidade alta, também, para a condição H. Não se encontraram diferenças significativas ($p = 0.21$) para o consumo energético, mas foi possível ver tamanhos de efeito entre pequenos e

médios (0.3), para as condições N a intensidade moderada e H a intensidade alta. Foram identificadas diferenças significativas entre os atletas para a variável RPE ($p = 0.038$), ao comparar as condições N e H na intensidade de 2mmol/l. Para a mesma variável (RPE), se encontraram tamanhos de efeito pequenos (0.2), sendo maior o esforço percebido pelos atletas na condição H, numa intensidade de 2mmol/l e para a condição N, numa intensidade de 4mmol/l, e entre pequenos e médios, para as condições N a 2mmol/l (0.3), e H com uma alta intensidade (0.4).

Tabela 5. Resultados das variáveis de desempenho físico e fisiológicas de acordo ao momento de avaliação e a intensidade de corrida.

Variáveis	Intensidade																
	2mmol/l				4mmol/l				F	%Δ				ES			
	NS	NC	HS	HC	NS	NC	HS	HC		2mmol/l		4mmol/l		2mmol/l		4mmol/l	
								N	H	N	H	N	H	N	H		
Velocidade	13.38 ± 1.85	13.38 ± 1.51	13.38 ± 1.19	13.63 ± 1.51	15.75 ± 1.28	15.88 ± 1.25	15.38 ± 1.19	15.38 ± 1.41	0	1.87	0.79	0	0	-0.2	-0.1	0	
FC (bpm)	153.63 ± 20.48	151.25 ± 15.73	158.5 ± 12.5	157.63 ± 16.75	173.5 ± 12.88	173.13 ± 12.26	175.88 ± 11.54	172.5 ± 13.85	-1.55	-0.55	-0.22	-1.92	0.1	0.1	0	0.3	
VO2máx (ml/kg/min)	46.05 ± 4.87	45.02 ± 4.27	47.99 ± 4.27	47.38 ± 4.8	56.07 ± 3.79	56.21 ± 5.6	55.86 ± 4.64	55.45 ± 3.79	17.87*	-2.23	-1.27	0.24	-0.74	0.2	0.1	0	0.1
VE (L)	88.04 ± 21.54	83.5 ± 12.86	93.17 ± 18.07	93.96 ± 15.16	119.68 ± 17.08	119.57 ± 12.41	120.61 ± 20.53	122.54 ± 12.83	-5	0.85	-0.08	1.6	0.2	0	0	-0.1	
QR	0.91 ± 0.03	0.92 ± 0.04	0.9 ± 0.04	0.91 ± 0.04	0.97 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.95 ± 0.02	0.94 ± 0.03	0.27	1.25	1.16	-0.66	-0.1	-0.1	-0.1	0.1	
PAS (mmHg)	167.5 ± 17.4	165.25 ± 20	162.88 ± 17.9	155.75 ± 20.55	198 ± 25.2	202.88 ± 15.98	189.75 ± 20.53	184.13 ± 19.53	-1	-4.37	2.01	-2.96	0.1	0.4	-0.2	0.3	
PAD (mmHg)	77 ± 4	73.63 ± 8	77 ± 7.76	70.75 ± 7.46	73.75 ± 6.09	68.25 ± 8.17	73.25 ± 8.75	68.38 ± 6.52	-4.38	-8.12	-7.46	-6.67	0.5	0.8	0.8	0.6	
PAM (mmHg)	107.17 ± 5.57	105.63 ± 7.09	104.17 ± 4.12	99.08 ± 4.67	115.46 ± 8.5	112.08 ± 8.37	113.13 ± 4.93	106.96 ± 6.7	-2.8	-6.19	-2.02	-4.57	0.6	0.4	1	0.7	
Dispersão Energético Total	43.62 ± 4.38	41.31 ± 3.84	44.24 ± 4.05	44.62 ± 5.21	55.39 ± 5.86	55.52 ± 6.93	55.63 ± 5.53	53.27 ± 6.24	18.93*	-5.3	0.87	0.24	-4.25	0.6	-0.1	0	0.4
Dispersão Energético Aeróbio	94.58 ± 2.49	94.46 ± 2.64	94.89 ± 3.12	92.82 ± 3.63	90.69 ± 3.78	90.6 ± 3.47	89.85 ± 2.9	91.48 ± 1.73	-0.12	-2.18	-0.1	1.81	0	0.6	0	-0.7	
Dispersão Energético Anaeróbio	5.42 ± 2.49	5.61 ± 2.57	5.11 ± 3.12	7.18 ± 3.63	9.31 ± 3.78	9.4 ± 3.47	10.15 ± 2.9	8.52 ± 1.73	3.43	40.47	0.95	-16.04	0	-0.6	0	0.7	
Consumo Energético	189.12 ± 10.88	186.01 ± 12.71	199.01 ± 17.69	196.86 ± 15.87	211.11 ± 15.71	209.89 ± 20.67	217.37 ± 18.65	211.66 ± 14.52	-1.64	-1.08	-0.59	-2.63	0.3	0.1	0.1	0.3	
RPE	4.63 ± 2.07	4 ± 2.14	5.13 ± 1.46	4.75 ± 1.75	7.5 ± 1.93	7.13 ± 1.64	8 ± 1.07	7.5 ± 1.69	22.37*	-13.51	-5	-7.32	-6.25	0.3	0.2	0.2	0.4

N = condições ambientais clássicas de climatério de laboratório; H = condições ambientais de stresse por calor; NS = condições ambientais clássicas de climatério de laboratório sem aclimação ao calor; HS = condições ambientais de stresse térmico sem aclimação ao calor; NC = condições ambientais clássicas de climatério de laboratório com aclimação ao calor; HC = condições ambientais de stresse térmico com aclimação ao calor. * = p < 0.05 NC 2mmol/l x HC 2mmol/l; %Δ = percentagem de variação; ES = tamanho do efeito; p = significância; 2 mmol/l = intensidade moderada; 4 mmol/l = intensidade alta; FC = frequência cardíaca; VE = ventilação; QR = quociente respiratório; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; RPE = esforço percebido.

A seguir, os resultados mais importantes das variáveis fisiológicas são apresentados em figuras (para melhor compreensão das figuras, Quente = Stress por calor).

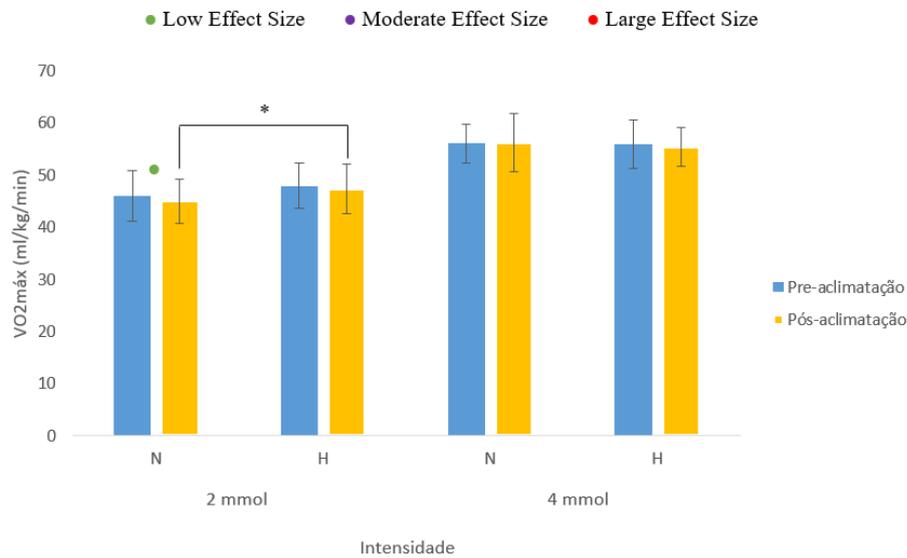


Figura 12. Efeito da aclimatação no consumo máximo de oxigênio.

Os dados são apresentados como média \pm DP. N = 8. * = $p < 0.05$. Sendo observado um VO2máx maior no ambiente quente que no ambiente normal numa intensidade de 2mmol/l.

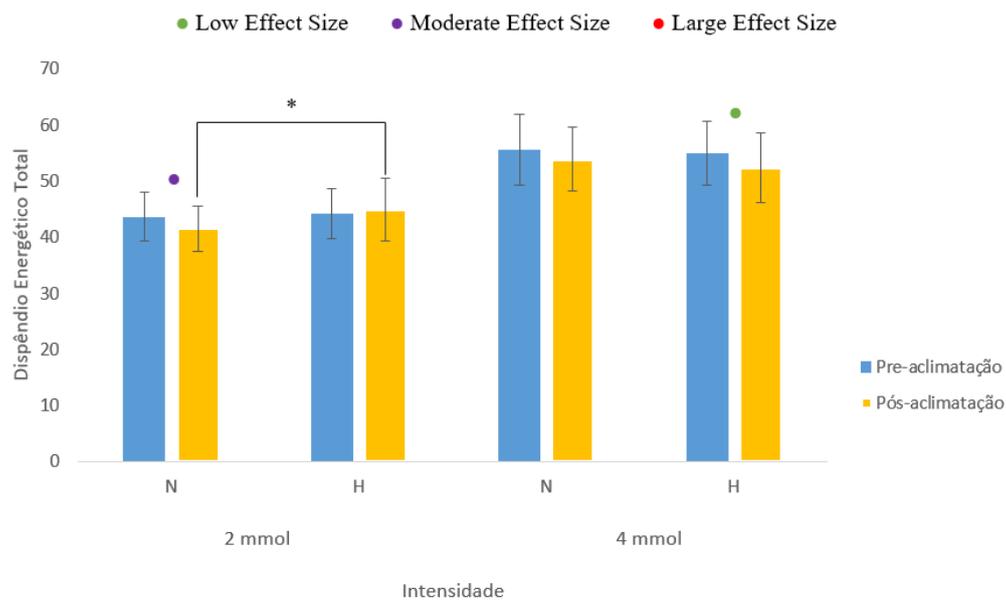


Figura 13. Efeito da aclimatação no dispêndio energético total.

Os dados são apresentados como média \pm DP. N = 8. * = $p < 0.05$. Foi encontrado um dispêndio energético menor no ambiente normal que no ambiente quente numa intensidade moderada (2mmol/l).

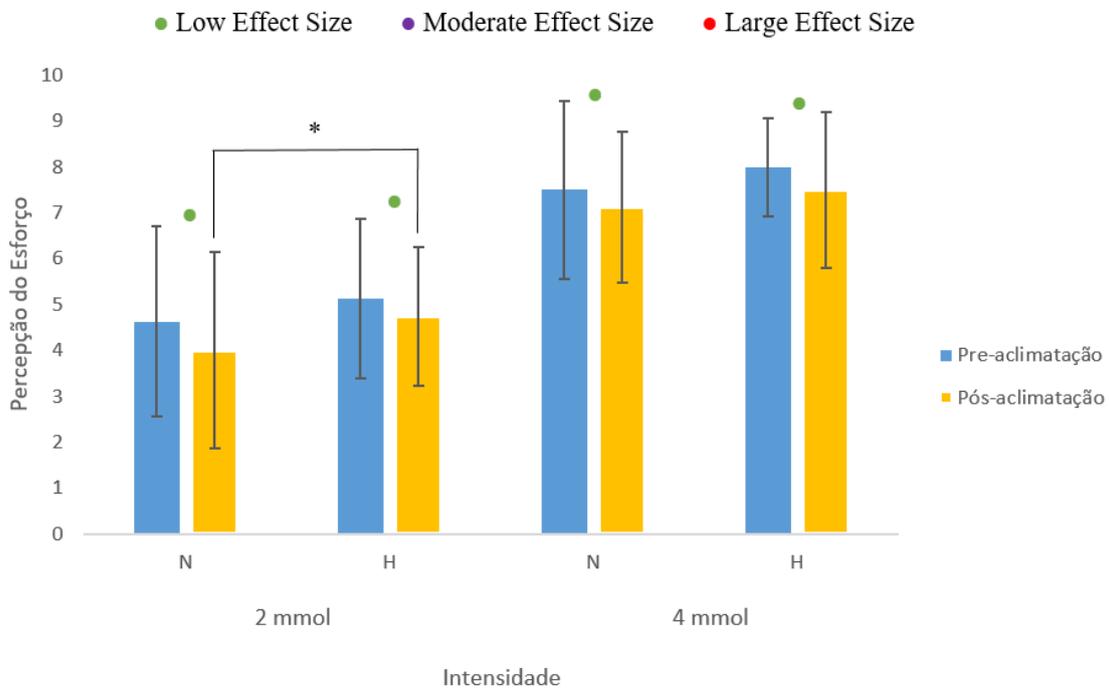


Figura 14. Efeito da aclimação na percepção do esforço.

Os dados são apresentados como média \pm DP. N = 8. * = $p < 0.05$. Sendo observado um RPE maior no ambiente quente que no ambiente normal numa intensidade de 2mmol/l.

A seguir, na figura 15, são apresentados graficamente os resultados das variáveis fisiológicas nas quais, apesar de não terem sido mostradas diferenças significativas, são consideradas importantes devido aos valores dos tamanhos de efeito encontrados (ver tabela 5 para mais informação).

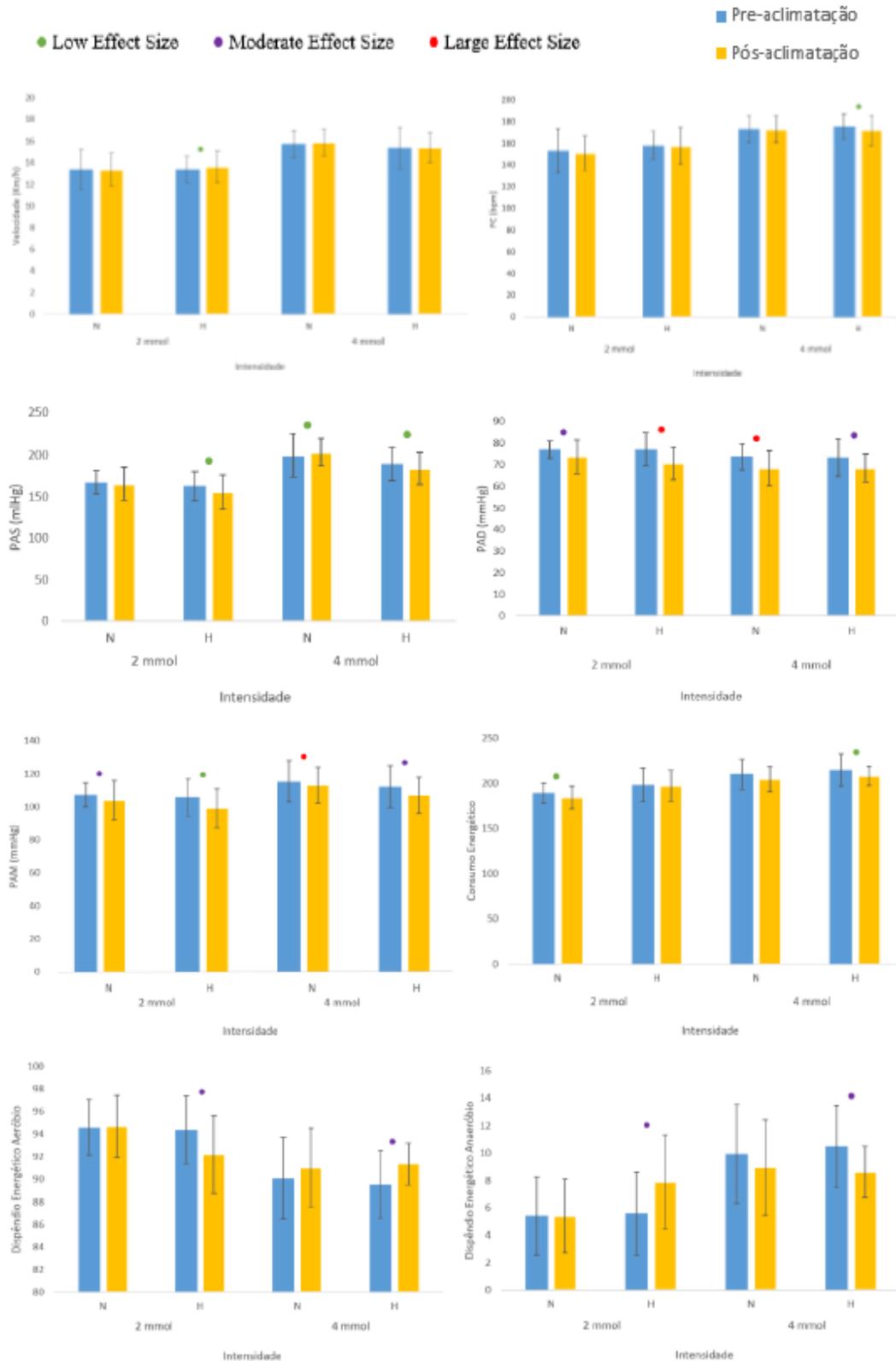


Figura 15. Efeito da aclimação na Velocidade, FC, PAS, PAD, PAM e Consumo Energético, como resposta a intervenção do exercício nos diferentes momentos de avaliação.

4.5 RESULTADOS DAS VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

Os resultados para os marcadores bioquímicos, imunitários e endotóxicos (plasmáticos e salivares) avaliados neste estudo são explicados a seguir. Para a variável IL-6 foi possível identificar aumentos significativos após o exercício nos momentos de ambiente normal (0.022), e de stresse por calor (0.024) antes da aclimação, bem como uma diminuição dos valores no ambiente de stresse térmico após a aclimação (0.01). Não foram encontradas diferenças significativas no ambiente normal após o exercício ($p = 0.322$). Em relação à IL-15, não se encontraram diferenças significativas na pré-aclimação para nenhum dos ambientes (NS, $p = 0.567$; HS, $p = 0.113$), entanto que, sim foram encontradas diferenças significativas tanto no ambiente normal ($p = 0.022$), como no ambiente de stresse por calor ($p = 0.036$), sendo inferiores os valores pós-exercício em comparação aos valores pré-exercício. Identificaram-se diferenças significativas para a variável IL-10 na condição de ambiente normal pós aclimação ($p = 0.038$), sendo identificado um aumento nos valores após a intervenção do exercício. Para o TNF- α , diferenças significativas foram encontradas no ambiente normal após a aclimação ($p = 0.037$), sendo identificados aumentos nos valores. Tanto para IL-1 β como para IL-1ra, na condição de stresse por calor após a aclimação, os valores aumentaram depois da intervenção do exercício, sendo estas variações significativas ($p = 0.004$). Para CD14 solúvel, foram identificadas duas diferenças significativas, a primeira foi uma diminuição nos valores, após a intervenção do exercício no ambiente normal pré-aclimação (0.007), e a segunda um aumento nos valores no ambiente de stresse por calor pós-aclimação (0.005). A testosterona apresentou aumentos nos valores após o exercício nos quatro momentos de medição, mas, só foram encontradas diferenças significativas em três deles, no ambiente normal ($p = 0,003$), e no ambiente de stresse térmico ($p = 0,011$) antes da aclimação, e também, de novo, no ambiente normal, porém, sendo os atletas já

aclimatados ($p = 0.014$). Não houve diferenças significativas para o Cortisol, o rácio TNF— α /IL-10, o rácio IL-1 β /IL-1ra e o rácio Testosterona/Cortisol (ver tabela 6 para mais informação).

Tabela 6. Resultados do efeito da intervenção do exercício nos indicadores bioquímicos, imunitários e endotóxicos obtidos nos momentos experimentais.

Variáveis	Pre-exercício	Pós-exercício	F	%Δ	ES	ES(A)	
						N	H
IL-6 (pg/ml)							
NS	4.33 ± 0.58	4.98 ± 0.67	-2.94*	15.05	-1		
HS	4.27 ± 0.28	4.70 ± 0.47	-2.86*	10.15	-1.2		
NC	4.76 ± 1.56	5.09 ± 1.32	-1.07	7.02	-0.2	0.5	0.8
HC	4.98 ± 1.13	4.11 ± 1.10	3.49**	-17.48	0.8		
IL-15 (pg/ml)							
NS	31.29 ± 12.23	29.88 ± 11.11	0.60	-4.53	0.1		
HS	45.68 ± 24.29	30.14 ± 9.19	1.81	-34.02	0.8		
NC	34.27 ± 8.03	23.59 ± 6.14	2.94*	-31.16	1.5	0	-0.1
HC	39.71 ± 14.50	24.59 ± 20.18	2.58*	-38.08	0.8		
IL-10 (pg/ml)							
NS	17.33 ± 4.50	27.72 ± 20.73	-1.48	59.99	-0.7		
HS	24.44 ± 17.60	37.20 ± 26.39	-1.05	52.24	-0.6		
NC	12.77 ± 3.90	16.06 ± 4.75	-2.54*	25.75	-0.8	-0.4	0.2
HC	17.97 ± 7.60	15.10 ± 5.48	1.84	-15.94	0.4		
TNF-α (pg/ml)							
NS	83.61 ± 46.89	104.27 ± 23.60	-1.01	24.71	-0.5		
HS	106.95 ± 31.81	103.80 ± 34.34	0.31	-2.94	0.1		
NC	90.66 ± 27.70	103.25 ± 29.82	-2.57*	13.89	-0.4	0	0.2
HC	87.84 ± 35.36	97.61 ± 44.95	-0.62	11.12	-0.2		
IL-1β (pg/ml)							
NS	17.73 ± 13.37	14.75 ± 11.48	0.69	-16.79	0.2		
HS	14.58 ± 11.12	12.91 ± 11.56	0.52	-11.42	0.1		
NC	18.84 ± 21.58	24.72 ± 22.48	-1.01	31.20	-0.3	0.2	-0.1
HC	18.49 ± 15.13	27.37 ± 16.98	-4.25**	48.04	-0.5		
IL-1ra (pg/ml)							
NS	201.84 ± 142.21	161.85 ± 104.56	0.90	-19.81	0.3		
HS	144.23 ± 87.83	122.20 ± 17.99	0.81	-15.27	0.3		
NC	218.78 ± 241.22	300.79 ± 239.32	-1.17	37.48	-0.3	0.4	-0.2
HC	219.80 ± 159.87	348.57 ± 217.84	-4.18**	58.59	-0.7		
sCD14 (ng/ml)							
NS	80.69 ± 15.71	61.70 ± 2.52	3.75**	-23.53	1.7		
HS	62.21 ± 3.43	61.98 ± 3.70	0.20	-0.37	0.1		
NC	60.36 ± 2.32	62.08 ± 2.86	-1.55	2.85	-0.7	-0.1	-1.3
HC	63.07 ± 4.44	66.32 ± 3.91	-4.08**	5.16	-0.8		
Cortisol (µg/L)							
NS	4.78 ± 2.94	6.27 ± 2.93	-1.19	31.13	-0.5		
HS	4.91 ± 3.12	5.95 ± 3.71	-0.89	21.15	-0.3		
NC	5.53 ± 2.6	6.38 ± 1.94	-0.88	15.43	-0.4	0.1	-0.5
HC	6.34 ± 4.01	7.44 ± 2.49	-0.64	17.38	-0.3		
Testosterona (µg/L)							
NS	0.078 ± 0.04	0.135 ± 0.07	-4.32**	72.93	-1		
HS	0.078 ± 0.05	0.129 ± 0.09	-3.42*	64.53	-0.7		
NC	0.105 ± 0.06	0.173 ± 0.1	-3.25*	65.13	-0.8	0.1	0.6
HC	0.104 ± 0.06	0.130 ± 0.05	-1.23	24.43	-0.4		
Rácio TNF- α/IL-10							
NS	5.17 ± 3.28	5.43 ± 2.84	-0.15	5.05	-0.1		
HS	5.74 ± 2.64	3.62 ± 1.92	1.65	-36.95	0.9		
NC	7.57 ± 3.15	6.67 ± 1.88	0.98	-12	0.3	0.8	-0.1
HC	5.5 ± 2.88	7.02 ± 3.74	-1.15	27.57	-0.4		
Rácio IL-1 β/IL-1ra							
NS	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.78	-0.68	0		
HS	0.09 ± 0.03	0.15 ± 0.15	-1.03	73	-0.5		
NC	0.1 ± 0.03	0.07 ± 0.03	2.29	-31.17	1	-0.7	-0.4
HC	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.02	1.29	-6.35	0.5		
Rácio T/C							
NS	0.016 ± 0.01	0.022 ± 0.02	-0.89	31.87	-0.2		
HS	0.016 ± 0.02	0.022 ± 0.02	-1.81	35.81	-0.3		
NC	0.019 ± 0.02	0.027 ± 0.05	-1.73	43.05	-0.2	0	0.3
HC	0.016 ± 0.02	0.017 ± 0.02	0.52	6	-0.1		

Os dados são os originais dos cálculos das concentrações. São apresentados como média ± DP; * < 0.05; ** < 0.01; Todas as variáveis são apresentadas em pg/ml a exceção de sCD14 (ng/ml) e Cortisol (µg/dL). N = Ambiente normal; H = Ambiente de stresse térmico; NS = Ambiente normal sem aclimação; HS = Ambiente quente sem aclimação; NC = Ambiente normal com aclimação; HC = Ambiente quente com aclimação. %Δ = Percentagem de variação; ES = Tamanho do efeito; ES(A) = Tamanho do efeito da aclimação.

A seguir, serão apresentados em figuras os resultados mais importantes das variáveis bioquímicas, imunológicas e endotóxicas. Para estes gráficos os dados são apresentados como δ (pós – pre), nos momentos de medição.

IL-6

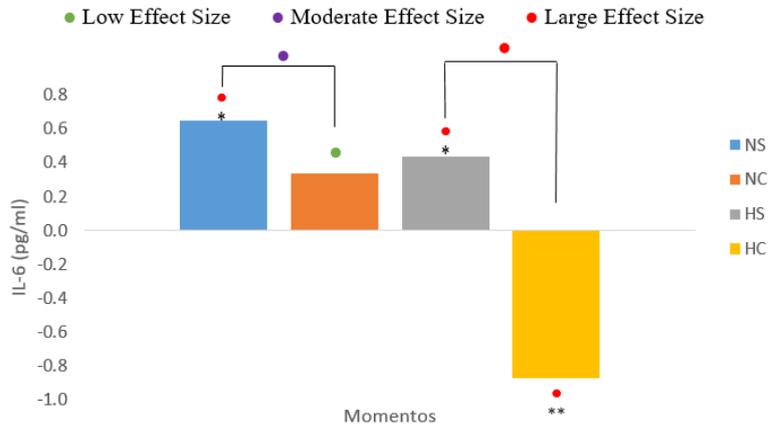


Figura 16. Δ nas concentrações de IL-6 após o exercício para cada momento de medição.

Na figura acima, pode-se observar como a IL-6 teve aumentos significativos nos climas normal e de stress térmico na pré-aclimatação e também uma diminuição significativa no ambiente de stress térmico no momento da pós-aclimatação.

IL-15

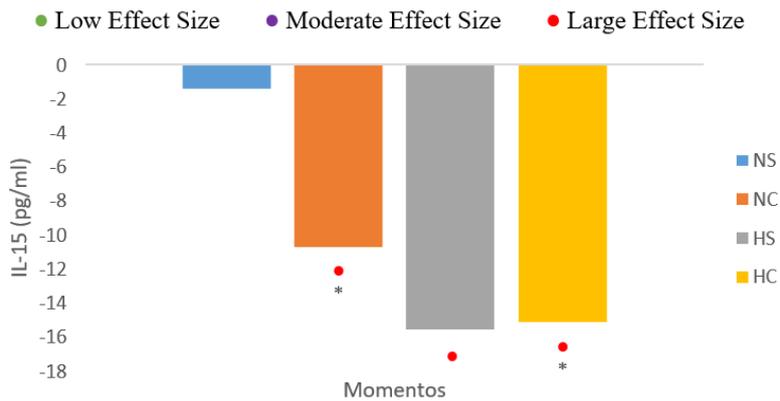


Figura 17. Δ nas concentrações de IL-15 após o exercício para cada momento de medição.

A IL-15 mostrou diminuições significativas nos momentos de pós-aclimatação, nos climas tanto normal como de stress térmico.

IL-10

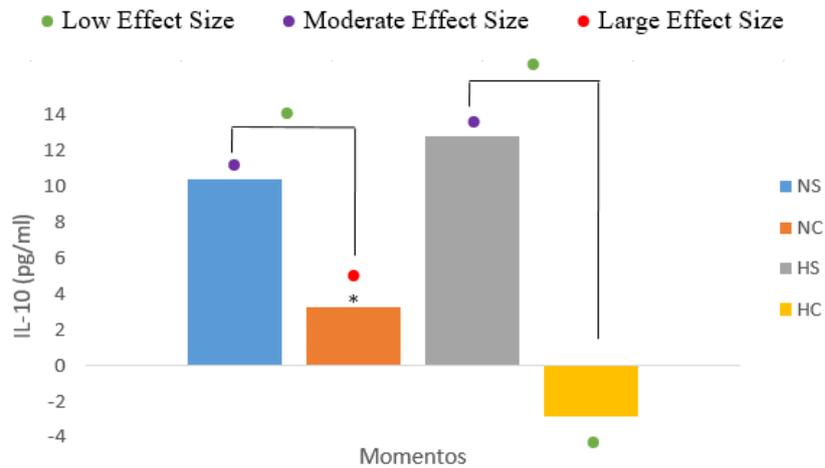


Figura 18. Δ nas concentrações de IL-10 após o exercício para cada momento de medição.

É possível identificar como para a IL-10, existem aumentos nos ambientes normal e de stresse por calor na pré-aclimatação, mas estes não foram significativos. Foi encontrada só uma diferença significativa no clima normal, para o momento de pós-aclimatação.

TNF- α

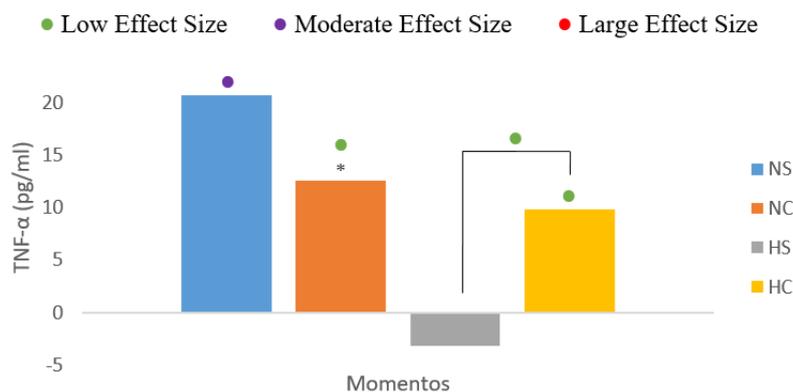


Figura 19. Δ nas concentrações de TNF- α após o exercício para cada momento de medição.

O fator de necrose tumoral alfa, apresentou diferenças significativas apenas no ambiente normal, na condição pós-aclimatação.

IL-1 β

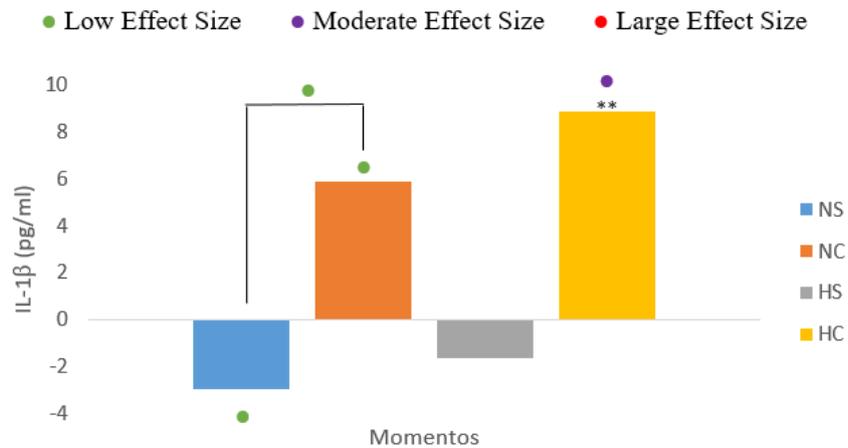


Figura 20. Δ nas concentrações de IL-1 β após o exercício para cada momento de medição.

Na figura 20, é possível observar como a IL-1 β , apresenta aumentos significativos no clima de stress térmico no momento da pós-aclimatação.

IL-1ra

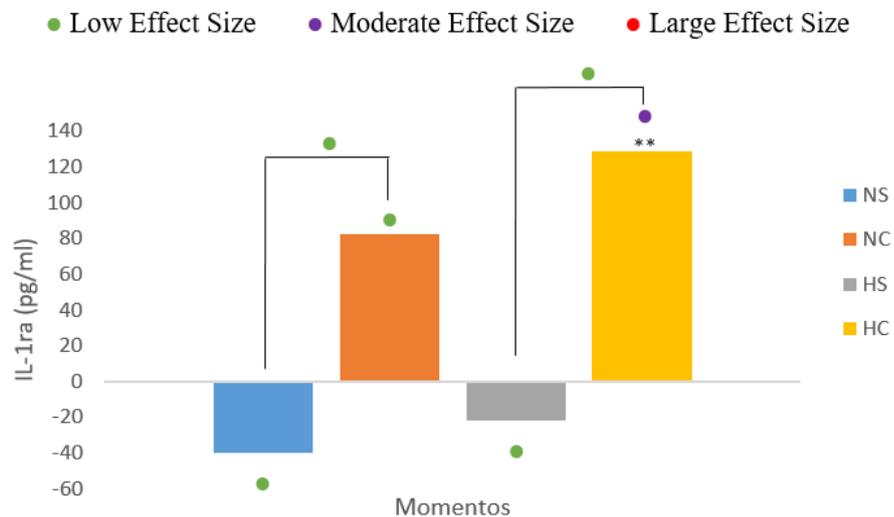


Figura 21. Δ nas concentrações de IL-1ra após o exercício para cada momento de medição.

Para a variável IL-1ra, foi possível ver aumentos significativos depois da aclimação, no clima de stress por calor.

sCD14

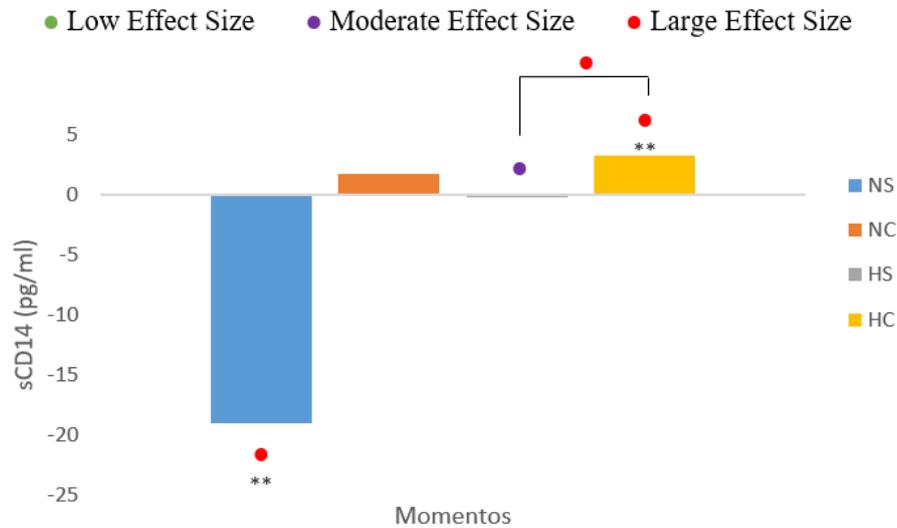


Figura 22. Δ nas concentrações de sCD14 após o exercício para cada momento de medição.

A CD14 solúvel apresentou diminuições significativas na pré-aclimatação, no momento de clima normal e aumentou no clima de estresse térmico após a aclimatação.

Testosterona

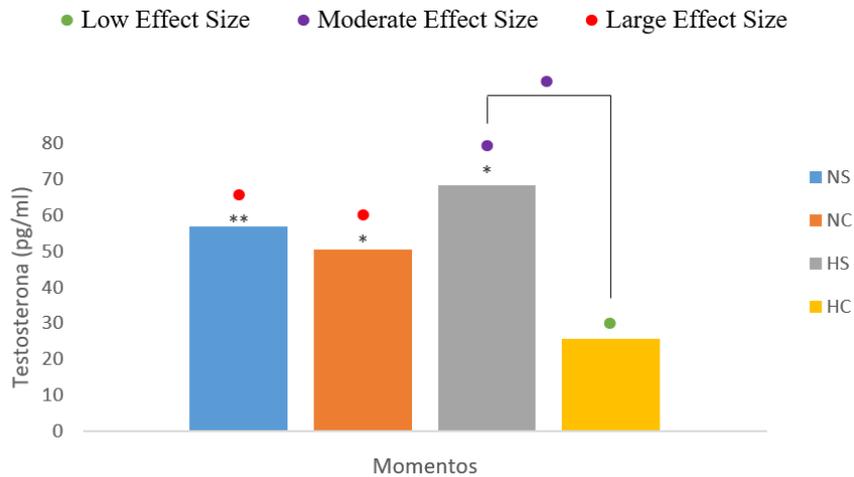


Figura 23. Δ nas concentrações de Testosterona após o exercício para cada momento de medição.

A testosterona, teve aumentos significativos nos dois diferentes climas na pré-aclimatação e também, pós-aclimatação no ambiente normal.

Cortisol, rácio T/C, rácio TNF- α /IL-10 e rácio IL-1 β /IL-1ra

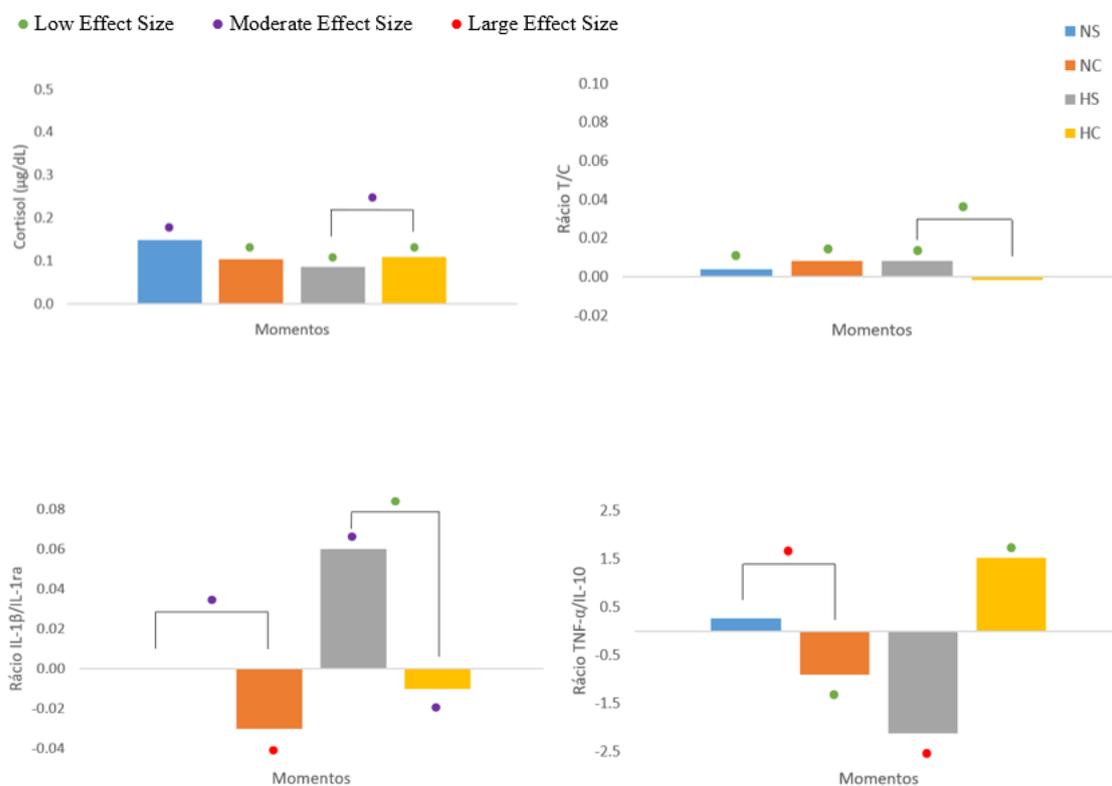


Figura 24. Δ nas concentrações de Cortisol, os rácios T/C, TNF- α /IL-10 e IL-1 β /IL-1ra, após o exercício para cada momento de medição.

Para o cortisol, assim como para os rácios T/C, TNF- α /IL-10 e IL-1 β /IL-1ra, não foram encontradas diferenças significativas.

4.6 RESULTADOS DA TEMPERATURA CORPORAL

Os resultados da temperatura corporal, mostrou diferenças significativas na temperatura corporal nos quatro momentos de medição após a intervenção de exercício (ver Tabela 7).

Tabela 7. Temperatura corporal dos atletas no momentos de medição (n = 8).

Temperatura Corporal					%Δ				ES	
	NS	HS	NC	HC	NS	HS	NC	HC	N	H
Pre-exercício	35.88 ± 0.65	35.56 ± 0.52	35.85 ± 0.47	35.78 ± 0.54						
					5.26	6.50	5.54	5.35	-0.1	0.3
Pós-exercício	37.76 ± 0.67**	37.88 ± 0.72**	37.84 ± 0.57**	37.69 ± 0.58**						

NS = ambiente clássico de clima pre-aclimatação; HS = ambiente de stresse térmico pré-aclimatação; NC = ambiente clássico de clima pós-aclimatação; HC = ambiente de stresse térmico pós-aclimatação. %Δ = percentagem de variação; ES = tamanho do efeito. A percentagem de variação e o tamanho do efeito foram calculados para determinar o efeito da intervenção do exercício em cada um dos momentos de avaliação. O tamanho do efeito foi calculado sobre o efeito da aclimatação nos ambientes em estudo; ** = p < 0.01 para Pré-exercício vs Pós-exercício.

4.7 RESULTADOS DO ESTADO DE HIDRATAÇÃO

A análise do estado de hidratação não mostrou diferenças significativas para nenhuma das variáveis que fazem parte desta representação nos atletas (ver tabela 8).

Tabela 8. Estado de hidratação dos atletas nas provas experimentais (n = 8).

Variáveis	Momentos			
	NS	NC	HS	HC
Massa Corporal Pre (Kg)	69.24 ± 6.96	68.88 ± 6.81	69.68 ± 7.14	69.40 ± 6.6
Massa Corporal Pós (Kg)	68.48 ± 6.73	68.30 ± 6.69	68.99 ± 7.12	68.64 ± 6.61
Δ massa (pós - pre)	-0.76 ± 0.51	-0.58 ± 0.18	-0.69 ± 1.89	-0.76 ± 0.18
Δ VP (pós - pre)	-4.4 ± 1.02	-4.5 ± 1.03	-5.35 ± 1.02	-5.01 ± 1.34
Deshidratação (%)	1.19 ± 0.46	0.91 ± 0.38	1.21 ± 0.42	1.25 ± 0.17
Densidade urina Pre (mOsm/d)	2.95 ± 1.6	3.38 ± 2.69	3.40 ± 1.94	3.41 ± 1.91
Densidade urina Pós (mOsm/d)	2.34 ± 1.25	3.49 ± 2.54	2.69 ± 1.76	3.20 ± 2.16
Osmolaridade da urina Pre (mOsm/kg)	486.2 ± 221.8	523.7 ± 365.5	551.2 ± 276.8	546.3 ± 252.8
Osmolaridade da urina Pós (mOsm/kg)	416.2 ± 202.3	556.3 ± 332.1	468.7 ± 212.9	518.7 ± 278.5
Cor da urina Pre (uds)	3.38 ± 1.51	3.63 ± 1.77	3.88 ± 1.55	3.87 ± 1.64
Cor da urina Pós (uds)	3.5 ± 1.6	4.25 ± 1.39	3.88 ± 1.55	4.98 ± 1.85

Os valores são média ± desvio padrão. Abreviaturas: NS = ambiente clássico de climátorio pre-aclimatação; HS = ambiente de stresse térmico pre-aclimatação; NC = ambiente clássico de climátorio pós-aclimatação; HC = ambiente de stresse térmico pós-aclimatação; VP: volume plásmatico.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal determinar o efeito do exercício em condições ambientais clássicas de laboratório assim como em condições ambientais de stresse térmico nas respostas fisiológicas, inflamatórias e endotóxicas em atletas, antes e depois de realizar um protocolo de aclimação ao calor. Para isso também foram feitas medições de temperatura e do estado de hidratação dos atletas.

Os dados das variáveis fisiológicas foram colhidos durante diferentes momentos da prova de esforço máximo, isto com o propósito de os analisar também a intensidades moderadas (2mmol/l) e altas (4mmol/l), realizadas nas condições ambientais clássicas de laboratório e de stresse térmico. Antes e depois de realizar a prova de esforço máximo, foram coletadas amostras de sangue e saliva, nas quais foram realizadas análises de variáveis bioquímicas, imunológicas e endotóxicas.

Para as variáveis fisiológicas, os principais resultados de acordo com o encontrado nas análises estatísticas inferenciais, foi que, para o $VO_{2\text{máx}}$, o dispêndio energético total e o RPE, foram significativamente maiores os valores no ambiente de stresse térmico em comparação ao ambiente normal numa intensidade moderada, após a aclimação ao calor ($p < 0.05$). Ao explicar estes resultados, é importante dizer que, se a pessoa não estiver adaptada ao ambiente onde vai realizar seus esforços, o ambiente por si mesmo, vai ser um fator estranho e exigirá mais do corpo dessa pessoa (González-Alonso, Crandall, & Johnson, 2008; González-Alonso et al., 1999; Nybo et al., 2014). E de acordo com estudos anteriores nesta área, isto causará diminuições no desempenho físico (Aragón-Vargas, Moncada-Jiménez, Hernández-Elizondo, Barrenechea, & Monge-Alvarado, 2009; Nybo et al., 2014; Pryor, Minson, & Ferrara, 2018). Portanto, para os dados obtidos durante as medições realizadas antes do tratamento de aclimação, seria correto encontrar maiores dispêndios energéticos, maiores exigências de oxigênio e maiores percepções de esforço, em um ambiente de stresse térmico do que em um ambiente clássico de laboratório, mas

não num momento de medição em que os atletas já estivessem aclimatados. Esse fato levou a tomar em consideração os ES para analisar esses resultados de forma mais detalhada, e assim foi possível ver que estas diferenças, significativas nesse momento, correspondem não a um aumento no $VO_{2\text{máx}}$, no dispêndio energético total ou no esforço percebido para as condições de stresse térmico, senão, a uma diminuição o suficientemente grande nos dados obtidos para estas três variáveis, mas, na condição de normais de laboratório na intensidade de 2mmol/l, após receberem o tratamento de aclimação. Assim, é de declarar que o tratamento de aclimação produz efeitos positivos de maior relevância, para o desempenho físico de atletas em intensidades moderadas, em ambientes nos quais os atletas já foram previamente aclimatados.

Para as demais variáveis fisiológicas não foram encontradas diferenças significativas, mas numa perspectiva da aplicabilidade prática, levando em consideração para isso os resultados dos cálculos dos tamanhos de efeito, acreditamos que foram obtidos resultados importantes para algumas das variáveis relacionadas com as adaptações cardiovasculares, especificamente, após a aclimação. A FC diminuiu o número de bpm, no ambiente de stresse por calor em alta intensidade, depois da aclimação, com tamanho de efeito considerado entre pequeno e médio ($ES = 0,3$), o que explica que, para os atletas, era necessário um número menor de bpm para satisfazer as necessidades de sangue de seus corpos, dadas as intensidades físicas que cumpriam nessas condições (Pryor et al., 2018). Outros estudos encontraram resultados semelhantes a este, sendo reconhecidos como adaptações ao tratamento de aclimação ao calor (Pandolf, 1998; Pryor et al., 2018; Pyne et al., 2014).

Para a pressão arterial sistólica, após aclimação ao calor, foram encontrados menores valores durante o esforço físico no ambiente de stresse por calor, tanto em intensidades moderadas ($ES = 0,4$) quanto altas ($ES = 0,3$). Além disso, um pequeno

aumento da pressão arterial sistólica foi encontrado no ambiente normal a 4mmol/l (ES = -0,2). A pressão arterial diastólica, por sua vez, apresentou queda em seus valores em todos os momentos de medição, sendo esses tamanhos de efeito considerados, médio, no ambiente normal (ES = 0,5), e grande, para o ambiente de stresse térmico (ES = 0,8), em intensidade moderada, e nas condições de intensidade alta, foi encontrado um tamanho de efeito grande para o ambiente clássico de laboratório (ES = 0,8), e entre médio e grande, para o ambiente de stresse térmico (ES = 0,6).

Para explicar essas alterações na pressão arterial sistólica e diastólica, deve-se dizer que à medida que a temperatura corporal aumenta, mais sangue é enviado para a pele, o enchimento cardíaco se deteriora, e isso ocorre porque o leito venoso da pele é grande e flexível e também dilata durante a hipertermia. Portanto, à medida que o fluxo sanguíneo da pele aumenta, os vasos sanguíneos da pele incham e acumulam grandes volumes de sangue, deslocando o sangue do tórax e reduzindo o volume sanguíneo central e o enchimento cardíaco (Rowell, 1986; Rowell, Marx, Bruce, Conn, & Kusumi, 1966). A complacência venosa aumenta com a temperatura central elevada (Wenger & Roberts, 1980), e talvez com a temperatura da pele alta (Rowell, 1974; Rowell, Brengelmann, Detry, & Wyss, 1971). Portanto, durante o stresse térmico, um aumento da complacência venosa prolonga o tempo de trânsito do sangue através da vasculatura cutânea para aumentar a troca de calor para o exterior, mas ao mesmo tempo diminui o volume sanguíneo central (aumentando o volume sanguíneo da pele), o que pode reduzir a pressão arterial diastólica, o enchimento cardíaco e a pressão arterial sistólica (Nybo et al., 2014).

As diferenças significativas encontradas para a temperatura corporal, como efeito do exercício, foram sempre aumentos -muito semelhantes-, para todos os momentos de avaliação, tanto no ambiente clássico de laboratório como no ambiente de stresse térmico após a prática de exercício ($p < 0.01$), o que indica que esse aumento na temperatura,

em maior parte, para este estudo em particular, vem a ser principalmente em resposta à prática de exercício e não por causa do ambiente. Mas, ao continuar a discutir da temperatura corporal, é preciso focar a atenção nos tamanhos de efeito, os quais são considerados como um cálculo complementar aos resultados estatísticos inferenciais, e resultado do tratamento da aclimação, foi possível identificar um tamanho de efeito ($ES = 0.3$), considerado entre pequeno e médio, para o ambiente de stresse térmico, o que significa que a temperatura corporal após a prática de exercício nestas condições foi menor depois da aclimação. Estudos anteriores estabeleceram independentemente que, quando a fadiga central ocorre devido ao exercício, não apenas o desempenho físico se deteriora acentuadamente, mas também a capacidade de dissipar o calor do corpo e, assim, iniciar um processo conhecido como hipertermia. Inversamente, mas associado a isso, acontece que a fadiga central parece ser influenciada pela atividade dos neurotransmissores do sistema dopaminérgico, mas também pelos sinais inibitórios dos termorreceptores que surgem como consequência das temperaturas elevadas do core, os músculos e a pele e o aumento do feedback aferente do aumento da ventilação e do stresse cardiovascular e alterações metabólicas nos músculos esqueléticos (González-Alonso, Mora-Rodríguez, Below, & Coyle, 1995; Nybo et al., 2014; Pryor et al., 2018).

No entanto, alterações induzidas por hipertermia em fatores cardiovasculares (frequência cardíaca, pressão arterial e PCO_2 arterial), bem como alterações na ventilação e feedback aferente ao sistema nervoso central dos músculos e receptores de temperatura, podem desempenhar um papel na fadiga. Portanto, a importância relativa dos fatores incluídos pode variar de acordo com a duração do exercício (curta vs. longa), a intensidade (submáxima vs. exercício intenso), modo de exercício (implicando grande massa muscular vs. pequena; influência da postura no retorno venoso), as características

de transferência de calor do ambiente (humidade, movimento do ar e carga radiante) e a tarefa de exercício (Nybo et al., 2014; Pyne et al., 2014).

O cortisol, como já foi mencionado no capítulo de resultados, não apresentou diferenças significativas. Apesar de, em alguns estudos, ter demonstrado uma ótima resposta às situações vivenciadas pelos sujeitos a diferentes testes de esforço físico em condições de stresse por calor (Ihsan, Périard, & Racinais, 2021; Keller, Kohne, Notbohm, Bloch, & Schumann, 2021; Peake et al., 2015; Willmott et al., 2018), também, em outros, não apresentou a resposta esperada, ou pelo menos não, sem ser um pouco mais forçada (Armstrong et al., 2012; Costello et al., 2018; Ganio et al., 2011). Por exemplo, no trabalho de Costello et al. (2018), os atletas tiveram que realizar o mesmo teste físico duas vezes, sob as mesmas condições de stresse térmico, mas, em um dos momentos mantendo-se num estado de euhidratação e no outro sendo submetidos à desidratação permissiva, e somente no momento da desidratação permissiva foram encontradas diferenças significativas para essa variável, o que nos leva a pensar que esse aumento nos valores após o exercício, pode não ser devido às condições ambientais em que os sujeitos realizaram os testes, mas também a uma diminuição significativa do volume plasmático (desidratação $\geq 2\%$ do peso corporal), ou que só a partir de uma perda na massa corporal total $\geq 2\%$, por meio da desidratação, é que se ativa o sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, por um circuito de feedback neuroendócrino que pode ser ativado por estímulos fisiológicos, como o stresse (por hipertermia) e o mesmo exercício (Corazza et al., 2014; Costello et al., 2018; Fry & Kraemer, 1997).

Os resultados para testosterona foram aumentos significativos antes da aclimação, independentemente do ambiente, e também para o ambiente clássico de laboratório após a aclimação ($p < 0,05$). Para o ambiente de stresse térmico, após a aclimação, apesar de se encontrar um aumento nos valores dessa variável, isso não foi

suficiente para achar diferenças significativas ($p > 0,05$). Estudos anteriores tem encontrado que o aumento na produção de testosterona após uma sessão de exercício está relacionado com a intensidade do exercício e ao volume total de treino (Fry, Kraemer, & Ramsey, 1998; Kraemer & Ratamess, 2005; Migiano et al., 2010; Vingren et al., 2010). De acordo com isso, para os resultados deste estudo, é possível dizer que, se levarmos em conta os valores médios de testosterona, velocidade final alcançada e esforço percebido, o volume total de trabalho permanece semelhante para os momentos em que foram encontradas diferenças significativas, mas diminui no momento em que não foram encontradas diferenças significativas (ambiente de stresse térmico, pós-aclimatação), além da existência de uma tendência de aumento ($ES = -0.4$). Portanto, esses resultados estão em melhor concordância com o encontrado por Rietjens et al. (2015), que declaram que a produção de testosterona está mais associada ao volume de treino total e não à sua intensidade, e por isso permanecerá semelhante, enquanto este volume de trabalho total se mantiver estável.

A elevação prolongada de citocinas inflamatórias pode significar fadiga acumulada, excesso de treino, falta de sono ou uma resposta neuroinflamatória (Vargas & Marino, 2014). Embora a concentração plasmática de várias outras citocinas inflamatórias possa ser afetada pelo exercício, a IL-6 tende a aumentar mais do que qualquer outra (Costello et al., 2018; Fischer, 2006). Neste estudo, foram encontradas variações na IL-6 nos momentos anteriores à aclimatação ao calor, tanto para o ambiente clássico de laboratório quanto para o ambiente de stresse por calor, apresentando aumentos significativos após a prática de exercício ($p < 0.05$). De acordo com evidências anteriores, pode haver diferenças na magnitude do aumento da concentração plasmática de IL-6 em atletas submetidos ao exercício em condições de stresse por calor sem ter realizado um protocolo prévio de aclimatação. Por exemplo, Costello et al. (2018),

indicaram que o efeito agudo do exercício no calor em atletas sem aclimação fez com que o nível de IL-6 dobrasse. Da mesma forma, Guy, Edwards, Miller, Deakin, and Pyne (2017), relataram que a maior mudança aguda na IL-6 após o exercício sob condições de stress térmica foi quatro vezes maior do que em repouso. Embora neste estudo tenham sido encontradas diferenças significativas após a prática de exercício nos momentos anteriores ao tratamento de aclimação ao calor, não foram encontradas diferenças entre os dois ambientes, portanto acreditamos que, apesar do exercício ter sido de alta intensidade, o tempo de exposição ao ambiente não foi o suficientemente longo para causar respostas inflamatórias por sua conta nos indivíduos. Embora tenham sido demonstradas várias fontes de IL-6, a contração muscular contribui com a maior parte da IL-6 presente na circulação em resposta ao exercício (Costello et al., 2018; Fischer, 2006), o que explicaria que os aumentos desta variável nos dois momentos vem a ser causada principalmente pelo exercício. Uma vez que as amostras de sangue só foram colhidas 10min após o final do exercício, também é possível que aumentos maiores nos níveis de IL-6 ocorridos durante e logo após o exercício já não tenham sido detectados devido a este lapso de tempo.

Após a aclimação ao calor, não foram encontradas diferenças significativas para IL-6 no ambiente clássico de laboratório e diminuições significativas foram encontradas após o exercício no ambiente de stress por calor ($p < 0.01$). Portanto, como mencionamos no parágrafo anterior, apesar do tempo de exposição ao ambiente não ter sido longo o suficiente para provocar respostas inflamatórias -por sua conta-, da mesma forma, a aclimação ao calor parece provocar menos respostas inflamatórias à prática de exercício.

Para IL-15, não foram encontradas diferenças significativas nos momentos prévios à aclimação ($p > 0,05$), e foram encontradas diminuições significativas para

ambos os ambientes após a aclimação ($p < 0,05$). A IL-15 é conhecida por ser um fator de crescimento, altamente expresso no músculo esquelético. Embora a IL-15 tenha demonstrado ter efeitos anabólicos no músculo esquelético *in vitro* e *in vivo* (Eskandari et al., 2020), ela parece desempenhar um papel importante na redução da massa do tecido adiposo e foi hipotetizado um papel para a IL-15 no crosstalk músculo-gordura (Nielsen & Pedersen, 2007). Para além disso, baixas doses de IL-15 que imitam as respostas do exercício na circulação demonstraram melhorar a estrutura e aumentar as mitocôndrias na pele, sugerindo que a IL-15 é um sinal mitocondrial essencial para a cicatrização de lesões na pele do corpo humano (Wong, Crane, Kuo, Kim, & Crane, 2019). Em conclusão, a redução significativa dos níveis plasmáticos de IL-15 nos momentos após a aclimação ao calor indica que esse tratamento colaboraria para que os atletas não sofram lesões na pele após o exercício tanto em ambientes termoneutrais quanto em ambientes de stresse térmico.

O TNF- α apresentou diferenças significativas apenas para o momento do ambiente clássico de laboratório, após aclimação ao calor ($p < 0,05$), mas este não foi o momento que apresentou maiores valores médios nas concentrações desta citocina, nem percentagens de variação ou tamanhos de efeito maiores, e estes resultados também não concordam com resultados de estudos anteriores (Pedersen, Steensberg, & Schjerling, 2001; Petersen & Pedersen, 2005), pelo que vimos a dizer que os dados para essa variável são inconclusivos. No entanto, foi previamente estabelecida por Petersen and Pedersen (2005), a possibilidade de que, durante o exercício, as fibras musculares produzam IL-6 através de uma via independente de TNF- α e que a IL-6 estimule o aparecimento na circulação de outras citocinas anti-inflamatórias como IL-1ra e IL-10 e inibe a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α , e que, devido a isto, é que, justamente no momento em que a IL-6 não apresentou diferenças significativas, foi quando estas o foram para o

TNF- α . As respostas para IL-10 foram diferenças significativas ($p < 0.05$), somente no mesmo momento que TNF- α . Como tem sido explicado em outros estudos, é conhecido que a imunomodulação de IL-10 é aumentado pela estimulação da quantidade de IL-6 ou células T_{reg} na corrente sanguínea (Balducci et al., 2010; Gleeson et al., 2011). Balducci et al. (2010), num estudo que usou, um modelo de rato a correr, examinou as respostas das células T_{reg} circulantes ao treino físico de moderada ou alta intensidade. Apenas o treino de alta intensidade resultou em aumento no número de células T_{reg}. Uma das principais moléculas identificada como responsável pela imunomodulação mediada por T_{reg} é a IL-10. Como os níveis de intensidade nas provas físicas para este estudo foram altos, é, portanto, possível, que a maior concentração plasmática da IL-10 possa estar associada com o aumento do número de T_{regs} circulantes, a principal fonte de IL-10 no corpo. Não foram encontradas diferenças significativas por causa da aclimação ao calor para TNF- α ($p = 0.98$) nem para IL-10 ($p = 0.33$).

Os níveis de concentração plasmático de IL-1 β , tem tendência a aumentar em resposta à lesão muscular (Minuzzi, Teixeira, & Paiva, 2017). Neste estudo, foi encontrado que os níveis de IL-1 β aumentaram depois do exercício, para o momento de stresse térmico após aclimação ($p < 0.01$; $\% \Delta = 48.04$). Esses resultados não são os esperados e até são contraditórios com aqueles encontrados em outros estudos anteriores a este, onde para o mesmo esforço físico em condições de stresse térmico, os níveis de IL-1 β diminuem após a aclimação ao calor o que também era o esperado para este, mas não foi assim. Acreditamos também que esse aumento nas concentrações de IL-1 β possa dever-se à desidratação em atletas (1,25%). Embora o percentual de perda de líquido não tenha atingido o 2% do peso corporal total, foi o momento em que o maior volume foi perdido. Os resultados para IL-1ra também foram aumentos depois do exercício, para o momento de stresse térmico após aclimação ($p < 0.01$; $\% \Delta = 58.59$), mas, para esta

variável, esses resultados são considerados como de resposta anti-inflamatória à IL-1 β e inicialmente estimulados pela produção da IL-6 (Gleeson et al., 2011).

Ao analisar os resultados destas citocinas e outros fatores associados ao stresse oxidativo de uma forma conjunta e generalizada, é correto afirmar que os mesmos não são idênticos, mas apresentam muitas semelhanças com os efeitos anti-inflamatórios do exercício no modelo proposto por Gleeson et al. (2011), e também com as teorias sobre os benefícios anti-inflamatórios do exercício, propostas em outros estudos (Suzuki, 2018).

As descobertas de Costello et al. (2018), Guy et al. (2017), Guy, Pyne, Deakin, Miller, and Edwards (2016), Willmott et al. (2018) e também os resultados deste estudo, sugerem que não houve efeitos inflamatórios crônicos nos processos de aclimação ao calor, independentemente de ter sido ou não permitida a hidratação. Isso é apoiado pela constatação de que os níveis de IL-6, IL-15, TNF- α e IL-1 β , retornam a valores muito próximos da linha de base, antes dos participantes comparecerem ao laboratório cada dia, para realizar os testes correspondentes. Este fato confirma que um curto processo de aclimação ao calor (≤ 8 sessões), não afetará o nível de desempenho físico dos atletas e permitirá que eles mantenham a funcionalidade de seu sistema imunitário.

Imediatamente após o exercício, a sCD14 mostrou uma diminuição significativa em suas concentrações no ambiente clássico de laboratório prévio à aclimação (-23,53%; $p < 0,05$), e também apresentou aumentos significativos no ambiente de stresse por calor após a aclimação (5,16%; $p < 0,05$). Esses resultados não concordam com o que foi encontrado em estudos anteriores, onde foi demonstrado que o stresse devido ao esforço físico per se (em condições ambientais termoneutras), ou stresse devido ao esforço físico em condições ambientais de stresse térmico, promovem um aumento nesta endotoxina (Costa, Gaskell, McCubbin, & Snipe, 2020). Em geral, o exercício extenuante

tende a resultar em aumento, ainda que inconsistente, nos valores de algumas citocinas, devido à dependência do esforço geral de algumas delas, que utilizamos como marcadores pró-inflamatórios e de resposta inflamatória, incluindo entre eles a IL-1 β (Costa et al., 2020). Os resultados da sCD14, além da condição ambiental, andam de mãos dadas com os aumentos também encontrados neste momento de medição para IL-1 β , e como já foi proposto por outros autores, esta interleucina promove a produção desta endotoxina, bem como sua liberação na corrente sanguínea (Leiper, 2015; Snipe, Khoo, Kitic, Gibson, & Costa, 2018a, 2018b).

Afirmamos que nas condições de stresse térmico, após a aclimatação, ocorreu uma endotoxemia nos atletas, que poderia ter sido produzida por uma lesão intestinal que cria a ruptura da barreira, pela hiperpermeabilidade epitelial, que pode ser causada pela falta de sangue nos intestinos (que é usado para suprir a massa muscular, para suprir as demandas de oxigênio no corpo ou para dissipar a temperatura), ou uma combinação de ambas (Costa et al., 2020). Isso pode ser visto não só pelo aumento significativo da sCD14 ($\Delta = 5.16\%$; $p < 0.05$), senão também, a partir do perfil de citocinas resultante, especificamente IL-1 β ($\Delta = 48.04\%$; $p < 0.05$), TNF- α ($\Delta = 11.12\%$) e IL-1ra ($\Delta = 58.59\%$; $p < 0.05$). De fato, estes resultados, de acordo com a teoria, permitem dizer que foram encontradas evidências que estão a mostrar citocinemia sistêmica pronunciada, semelhante à da sepse clínica, na presença de endotoxemia associada ao exercício em condições de stresse térmico, em comparação com o stresse de esforço físico sozinho, onde a magnitude do stresse total não foi suficiente para induzir distúrbios nas endotoxinas liberadas nem nas concentrações de citocinas.

Sugerimos para estudos futuros que, além da concentração de endotoxina circulante e das concentrações de citocinas plasmáticas, que também sejam avaliados anticorpos contra endotoxina (por exemplo, IgG e IgM), para determinar a resposta imune

à infecção, endotoxemia e interpretar a concentração da endotoxina no contexto da capacidade do corpo de a eliminar (Bosenberg, Brock-Utne, Gaffin, Wells, & Blake, 1988; Brock-Utne et al., 1988; Camus et al., 1998; Camus et al., 1997).

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

6.1 CONCLUSÕES

Em conclusão, desde o ponto de vista fisiológico, verificou-se, que apesar de haver poucas diferenças significativas (VO_2 máx, dispêndio energético total e RPE), também foram identificados tamanhos de efeito de importante aplicabilidade prática, principalmente, adaptações cardiovasculares (FC; PAS; PAD), e termorregulatórias (temperatura corporal; desidratação), que colaboram para atender de melhor forma às demandas associadas à prática de exercício físico em condições de stress térmico, corroborando em parte resultados de estudos anteriores a este.

Do ponto de vista inflamatório, indicadores pro-inflamatórios como a IL-6 e IL-15 apresentaram diminuições nas suas concentrações após a aclimação ao ser comparadas com os valores prévios nas mesmas condições ambientais. Embora as concentrações de IL-1 β estejam aumentadas nos atletas, no momento de stress por calor após a aclimação, as concentrações de IL-1ra também foram maiores nesse momento, sugerindo uma tendência dos atletas para a manutenção e funcionalidade do seu sistema imunitário.

Uma percentagem de desidratação de pelo menos 1.25% do peso corporal total, pode provocar aumentos nas concentrações de IL-1 β e relacionado a isto, respostas endotóxicas, manifestado por aumentos nas concentrações de sCD14.

É confirmado que um protocolo de aclimação como o que foi utilizado neste estudo (sete sessões de aclimação aplicadas em dias não contínuos), não provoca respostas inflamatórias crônicas em atletas bem treinados.

6.2 SUGESTÕES PARA FUTUROS ESTUDOS

As principais sugestões para futuros estudos:

- Fazer recolhas adicionais de sangue e saliva em momentos de tempo posteriores ao momento “imediate” de finalizar o teste físico, por exemplo uma ou duas horas depois. Isso porque estudos anteriores mostraram que algumas variáveis bioquímicas demoram um pouco mais para mostrar suas respostas.
- Contar com um grupo de controlo e aumentar o número da amostra.
- Incluir avaliações de anticorpos contra endotoxina (por exemplo, IgG e IgM), para determinar a resposta imune à infecção por endotoxemia e interpretar a concentração da endotoxina no contexto da capacidade do corpo de a eliminar.
- Incluir variáveis que estudam o possível dano na barreira gastrointestinal, como por exemplo, o LPS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adolph, E. F. (1964). *Tasks of Physiologists*. *The Physiologist*, 60, 7-8.
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). *Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey*. *Blood*, 119(3), 651-665. doi: 10.1182/blood-2011-04-325225
- Aldous, J. W. F., Christmas, B. C. R., Akubat, I., Stringer, C. A., Abt, G., & Taylor, L. (2019). *Mixed-methods pre-match cooling improves simulated soccer performance in the heat*. *Eur J Sport Sci*, 19(2), 156-165. doi: 10.1080/17461391.2018.1498542
- 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*. *J Sports Sci*, 26(6), 653-661. doi: 10.1080/02640410701716790
- Amaro-Gahete, F. J., Sanchez-Delgado, G., Jurado-Fasoli, L., De-la, O. A., Castillo, M. J., Helge, J. W., & Ruiz, J. R. (2019). *Assessment of maximal fat oxidation during exercise: A systematic review*. *Scand J Med Sci Sports*, 29(7), 910-921. doi: 10.1111/sms.13424
- Aragón-Vargas, L. F., Moncada-Jiménez, J., Hernández-Elizondo, J., Barrenechea, A., & Monge-Alvarado, M. (2009). *Evaluation of pre-game hydration status, heat stress, and fluid balance during professional soccer competition in the heat*. *European Journal of Sport Science*, 9(5), 269-276.
- Armstrong, L. E. (1998). *Heat acclimatization*. *Encyclopedia of sports medicine and science*.
- Armstrong, L. E., Ganio, M. S., Casa, D. J., Lee, E. C., McDermott, B. P., Klau, J. F., Jimenez, L., Le Bellego, L., Chevillotte, E., & Lieberman, H. R. (2012). *Mild dehydration affects mood in healthy young women*. *J Nutr*, 142(2), 382-388. doi: 10.3945/jn.111.142000
- Armstrong, L. E., Hubbard, R. W., Askew, E. W., & Francesconi, R. P. (1993). *Responses of soldiers to 4-gram and 8-gram NaCl diets during 10 days of heat acclimation*. *Nutritional Needs in Hot Environments: Applications for Military Personnel in Field Operations*, 247.
- Armstrong, L. E., & Maresh, C. M. (1991). *The induction and decay of heat acclimatisation in trained athletes*. *Sports Med*, 12(5), 302-312. doi: 10.2165/00007256-199112050-00003
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2012). *Fundamentos de imunologia*.
- Arruda, A. F., Aoki, M. S., Freitas, C. G., Spigolon, L. M., Franciscon, C., & Moreira, A. (2015). *Testosterone Concentration and Lower Limb Power Over an Entire Competitive Season in Elite Young Soccer Players*. *J Strength Cond Res*, 29(12), 3380-3385. doi: 10.1519/jsc.0000000000000993
- Balducci, S., Zanuso, S., Nicolucci, A., De Feo, P., Cavallo, S., Cardelli, P., Fallucca, S., Alessi, E., Fallucca, F., & Pugliese, G. (2010). *Effect of an intensive exercise intervention strategy on modifiable cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial: the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES)*. *Arch Intern Med*, 170(20), 1794-1803. doi: 10.1001/archinternmed.2010.380
- Banchereau, J., Pascual, V., & O'Garra, A. (2012). *From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines*. *Nat Immunol*, 13(10), 925-931. doi: 10.1038/ni.2406

- Banfi, G., Marinelli, M., Roi, G. S., & Agape, V. (1993). Usefulness of free testosterone/cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. *Int J Sports Med*, 14(7), 373-379. doi: 10.1055/s-2007-1021195
- Barberio, M. D., Elmer, D. J., Laird, R. H., Lee, K. A., Gladden, B., & Pascoe, D. D. (2015). Systemic LPS and inflammatory response during consecutive days of exercise in heat. *Int J Sports Med*, 36(3), 262-270. doi: 10.1055/s-0034-1389904
- Belge, K. U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., & Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 168(7), 3536-3542. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3536
- Bergeron, M. F. (2019). *Tennis in the Heat Heat Stress in Sport and Exercise* (pp. 219-234): Springer.
- Bircher, S., Knechtle, B., & Knecht, H. (2005). Is the intensity of the highest fat oxidation at the lactate concentration of 2 mmol L(-1)? A comparison of two different exercise protocols. *Eur J Clin Invest*, 35(8), 491-498. doi: 10.1111/j.1365-2362.2005.01538.x
- Bishop, N. C. (2013). Effects of exercise on acquired immune function. *Exercise Immunology*, 126-157.
- Bligh, J. (1973). *Temperature regulation in mammals and other vertebrates*.
- Borg, G. (1998). *Borg's perceived exertion and pain scales: Human kinetics*.
- Bosenberg, A. T., Brock-Utne, J. G., Gaffin, S. L., Wells, M. T., & Blake, G. T. (1988). Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *J Appl Physiol* (1985), 65(1), 106-108. doi: 10.1152/jappl.1988.65.1.106
- Brock-Utne, J. G., Gaffin, S. L., Wells, M. T., Gathiram, P., Sohar, E., James, M. F., Morrell, D. F., & Norman, R. J. (1988). Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race. *S Afr Med J*, 73(9), 533-536.
- Brolinson, P. G., & Elliott, D. (2007). Exercise and the immune system. *Clin Sports Med*, 26(3), 311-319. doi: 10.1016/j.csm.2007.04.011
- Burgmann, H., Winkler, S., Locker, G. J., Presterl, E., Laczika, K., Staudinger, T., Knapp, S., Thalhammer, F., Wenisch, C., Zedwitz-Liebenstein, K., Frass, M., & Graninger, W. (1996). Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clin Immunol Immunopathol*, 80(3 Pt 1), 307-310. doi: 10.1006/clin.1996.0128
- Campbell, D., & Stanley, J. (1963). *Experimental and quasi-experimental designs for research*. Chicago, Rand Mc. Nally.
- Campbell, D., & Stanley, J. (1970). *Diseños experimentales y cuasiexperimentales: Amorrortu: Buenos Aires*.
- Camus, G., Nys, M., Poortmans, J. R., Venneman, I., Monfils, T., Deby-Dupont, G., Juchmès-Ferir, A., Deby, C., Lamy, M., & Duchateau, J. (1998). Endotoxaemia, production of tumour necrosis factor alpha and polymorphonuclear neutrophil activation following strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 79(1), 62-68. doi: 10.1007/s004210050474
- Camus, G., Poortmans, J., Nys, M., Deby-Dupont, G., Duchateau, J., Deby, C., & Lamy, M. (1997). Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clin Sci (Lond)*, 92(4), 415-422. doi: 10.1042/cs0920415
- Castagna, C., Impellizzeri, F. M., Chaouachi, A., Bordon, C., & Manzi, V. (2011). *Effect of Training Intensity Distribution on Aerobic Fitness Variables in Elite Soccer Players:*

- A Case Study. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 25(1), 66-71. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181fef3d3
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral sciences*. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, Publicshers.
- Corazza, D., Sebastião, É., Pedrosa, R., Andreatto, C., Coelho, F., Gobbi, S., Teodorov, E., & Santos-Galduróz, R. (2014). Influence of chronic exercise on serum cortisol levels in older adults. *European Reviews of Aging & Physical Activity*, 11(1), 25-34.
- Costa, R. J. S., Gaskell, S. K., McCubbin, A. J., & Snipe, R. M. J. (2020). Exertional-heat stress-associated gastrointestinal perturbations during Olympic sports: Management strategies for athletes preparing and competing in the 2020 Tokyo Olympic Games. *Temperature (Austin)*, 7(1), 58-88. doi: 10.1080/23328940.2019.1597676
- Costello, J. T., Rendell, R. A., Furber, M., Massey, H. C., Tipton, M. J., Young, J. S., & Corbett, J. (2018). Effects of acute or chronic heat exposure, exercise and dehydration on plasma cortisol, IL-6 and CRP levels in trained males. *Cytokine*, 110, 277-283. doi: 10.1016/j.cyto.2018.01.018
- Cújar-Vertel, A. C., & Julio-Espitia, G. P. (2016). Evaluación de las condiciones térmicas ambientales del área de producción en una panadería en Cereté (Córdoba). *Entramado*, 12(1), 332-343.
- de Gonzalo-Calvo, D., Neitzert, K., Fernández, M., Vega-Naredo, I., Caballero, B., García-Macía, M., . . . Coto-Montes, A. (2010). Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radic Biol Med*, 49(5), 733-737. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.019
- Dill, D. B., & Costill, D. L. (1974). Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol*, 37(2), 247-248. doi: 10.1152/jappl.1974.37.2.247
- Dinarello, C. A. (2011). A clinical perspective of IL-18 as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol*, 41(5), 1203-1217. doi: 10.1002/eji.201141550
- Dinarello, C. A., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O'Neill, L., . . . Gabel, C. (2010). IL-1 family nomenclature. *Nat Immunol*, 11(11), 973. doi: 10.1038/ni1110-973
- Domínguez-Rodríguez, A., Abreu González, P., García, M. J., de la Rosa, A., Vargas, M., & Marrero, F. (2003). [Circadian variations in proinflammatory cytokine concentrations in acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol*, 56(6), 555-560. doi: 10.1016/s0300-8932(03)76916-4
- Drust, B., Rasmussen, P., Mohr, M., Nielsen, B., & Nybo, L. (2005). Elevations in core and muscle temperature impairs repeated sprint performance. *Acta Physiol Scand*, 183(2), 181-190. doi: 10.1111/j.1365-201X.2004.01390.x
- Ely, M. R., Chevront, S. N., Roberts, W. O., & Montain, S. J. (2007). Impact of weather on marathon-running performance. *Med Sci Sports Exerc*, 39(3), 487-493. doi: 10.1249/mss.0b013e31802d3aba
- Epstein, Y., & Roberts, W. O. (2011). The pathophysiology of heat stroke: an integrative view of the final common pathway. *Scand J Med Sci Sports*, 21(6), 742-748. doi: 10.1111/j.1600-0838.2011.01333.x
- Eskandari, A., Fashi, M., Saeidi, A., Boullosa, D., Laher, I., Ben Abderrahman, A., Jabbour, G., & Zouhal, H. (2020). Resistance Exercise in a Hot Environment Alters Serum

- Markers in Untrained Males. *Front Physiol*, 11, 597. doi: 10.3389/fphys.2020.00597
- Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R., & Ziegler-Heitbrock, H. W. (1998). Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol*, 112(3), 501-506. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00617.x
- Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev*, 12, 6-33.
- Frey, E. A., Miller, D. S., Jahr, T. G., Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T., Finlay, B. B., & Wright, S. D. (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 176(6), 1665-1671. doi: 10.1084/jem.176.6.1665
- Fry, A. C., & Kraemer, W. J. (1997). Resistance exercise overtraining and overreaching. Neuroendocrine responses. *Sports Med*, 23(2), 106-129. doi: 10.2165/00007256-199723020-00004
- Fry, A. C., Kraemer, W. J., & Ramsey, L. T. (1998). Pituitary-adrenal-gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining. *J Appl Physiol* (1985), 85(6), 2352-2359. doi: 10.1152/jappl.1998.85.6.2352
- Fujio, K., Okamura, T., & Yamamoto, K. (2010). The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Adv Immunol*, 105, 99-130. doi: 10.1016/s0065-2776(10)05004-2
- Ganio, M. S., Armstrong, L. E., Casa, D. J., McDermott, B. P., Lee, E. C., Yamamoto, L. M., Marzano, S., Lopez, R. M., Jimenez, L., Le Bellego, L., Chevillotte, E., & Lieberman, H. R. (2011). Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men. *Br J Nutr*, 106(10), 1535-1543. doi: 10.1017/s0007114511002005
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.010
- Gatti, R., & De Palo, E. F. (2011). An update: salivary hormones and physical exercise. *Scand J Med Sci Sports*, 21(2), 157-169. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01252.x
- Gaviglio, C. M., Osborne, M., Kelly, V. G., Kilduff, L. P., & Cook, C. J. (2015). Salivary testosterone and cortisol responses to four different rugby training exercise protocols. *Eur J Sport Sci*, 15(6), 497-504. doi: 10.1080/17461391.2015.1017012
- Gill, S. K., Teixeira, A., Rama, L., Prestes, J., Rosado, F., Hankey, J., Scheer, V., Hemmings, K., Ansley-Robson, P., & Costa, R. J. (2015). Circulatory endotoxin concentration and cytokine profile in response to exertional-heat stress during a multi-stage ultra-marathon competition. *Exerc Immunol Rev*, 21, 114-128.
- Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* (1985), 103(2), 693-699. doi: 10.1152/jappphysiol.00008.2007
- Gleeson, M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S. S., & Nimmo, M. A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol*, 11(9), 607-615. doi: 10.1038/nri3041
- González-Alonso, J., Crandall, C. G., & Johnson, J. M. (2008). The cardiovascular challenge of exercising in the heat. *J Physiol*, 586(1), 45-53. doi: 10.1113/jphysiol.2007.142158
- González-Alonso, J., Mora-Rodríguez, R., Below, P. R., & Coyle, E. F. (1995). Dehydration reduces cardiac output and increases systemic and cutaneous vascular resistance during exercise. *J Appl Physiol* (1985), 79(5), 1487-1496. doi: 10.1152/jappl.1995.79.5.1487

- González-Alonso, J., Teller, C., Andersen, S. L., Jensen, F. B., Hyldig, T., & Nielsen, B. (1999). Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *J Appl Physiol* (1985), 86(3), 1032-1039. doi: 10.1152/jappl.1999.86.3.1032
- Grant, S. M., K.; Newell, J., Wood, L., Keatley, S., Simpson, D., Leslie, K., & Fairlie-Clark, S. (2002). Reproducibility of the blood lactate threshold, 4 mmol·l⁻¹ marker, heart rate and ratings of perceived exertion during incremental treadmill exercise in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 87(2), 159-166. doi: 10.1007/s00421-002-0608-2
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C. F., Hauben, E., & Roncarolo, M. G. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood*, 116(6), 935-944. doi: 10.1182/blood-2009-07-234872
- Guy, J. H., Deakin, G. B., Edwards, A. M., Miller, C. M., & Pyne, D. B. (2015). Adaptation to hot environmental conditions: an exploration of the performance basis, procedures and future directions to optimise opportunities for elite athletes. *Sports Med*, 45(3), 303-311. doi: 10.1007/s40279-014-0277-4
- Guy, J. H., Edwards, A. M., Miller, C. M., Deakin, G. B., & Pyne, D. B. (2017). Short-term reliability of inflammatory mediators and response to exercise in the heat. *J Sports Sci*, 35(16), 1622-1628. doi: 10.1080/02640414.2016.1227464
- Guy, J. H., Pyne, D. B., Deakin, G. B., Miller, C. M., & Edwards, A. M. (2016). Acclimation Training Improves Endurance Cycling Performance in the Heat without Inducing Endotoxemia. *Front Physiol*, 7, 318. doi: 10.3389/fphys.2016.00318
- Hailman, E., Vasselon, T., Kelley, M., Busse, L. A., Hu, M. C., Lichenstein, H. S., Detmers, P. A., & Wright, S. D. (1996). Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *J Immunol*, 156(11), 4384-4390.
- Haskell, W. L., Lee, I. M., Pate, R. R., Powell, K. E., Blair, S. N., Franklin, B. A., Macera, C. A., Heath, G. W., Thompson, P. D., & Bauman, A. (2007). Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*, 116(9), 1081-1093. doi: 10.1161/circulationaha.107.185649
- 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 Med*, 45(5), 713-726. doi: 10.1007/s40279-015-0306-y
- Hayes, L. D., Grace, F. M., Sculthorpe, N., Herbert, P., Ratcliffe, J. W., Kilduff, L. P., & Baker, J. S. (2013). The effects of a formal exercise training programme on salivary hormone concentrations and body composition in previously sedentary aging men. *Springerplus*, 2(1), 18. doi: 10.1186/2193-1801-2-18
- Hayes, L. D., Sculthorpe, N., Young, J. D., Baker, J. S., & Grace, F. M. (2014). Critical difference applied to exercise-induced salivary testosterone and cortisol using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): distinguishing biological from statistical change. *J Physiol Biochem*, 70(4), 991-996. doi: 10.1007/s13105-014-0368-6
- Haziot, A., Rong, G. W., Lin, X. Y., Silver, J., & Goyert, S. M. (1995). Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *J Immunol*, 154(12), 6529-6532.

- Heled, Y., Fleischmann, C., & Epstein, Y. (2013). Cytokines and their role in hyperthermia and heat stroke. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 24(2), 85-96. doi: 10.1515/jbcp-2012-0040
- Hill, E. E., Zack, E., Battaglini, C., Viru, M., Viru, A., & Hackney, A. C. (2008). Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. *J Endocrinol Invest*, 31(7), 587-591. doi: 10.1007/bf03345606
- Hoffman-Goetz, L., & Pedersen, B. K. (1994). Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunol Today*, 15(8), 382-387. doi: 10.1016/0167-5699(94)90177-5
- Hori, S. (1995). Adaptation to heat. *Jpn J Physiol*, 45(6), 921-946. doi: 10.2170/jjphysiol.45.921
- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*, 16(5), 448-457. doi: 10.1038/ni.3153
- Ihsan, M., Périard, J., & Racinais, S. (2021). How to integrate recovery during heat acclimation. *Br J Sports Med*, 55(4), 185-186. doi: 10.1136/bjsports-2020-102390
- ISO. (1989). *Hot Environments - Estimation of the heat stress on working man, based on the WBGT index (Wet bulb globe temperature)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO. (1998). *Ergonomics of the thermal environment-Instruments for measuring physical quantities*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Jonsdottir, I. H. (2000). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: neuropeptides and their interaction with exercise and immune function. *Immunol Cell Biol*, 78(5), 562-570. doi: 10.1111/j.1440-1711.2000.t01-10-x
- Kakanis, M. W., Peake, J., Brenu, E. W., Simmonds, M., Gray, B., & Marshall-Gradisnik, S. M. (2014). T helper cell cytokine profiles after endurance exercise. *J Interferon Cytokine Res*, 34(9), 699-706. doi: 10.1089/jir.2013.0031
- Kalach, N., Rocchiccioli, F., de Boissieu, D., Benhamou, P. H., & Dupont, C. (2001). Intestinal permeability in children: variation with age and reliability in the diagnosis of cow's milk allergy. *Acta Paediatr*, 90(5), 499-504.
- Kallioli, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12(1), 49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169
- Kanikowska, D., Sato, M., Sugeno, J., Iwase, S., Shimizu, Y., Nishimura, N., & Inukai, Y. (2012). No effects of acclimation to heat on immune and hormonal responses to passive heating in healthy volunteers. *Int J Biometeorol*, 56(1), 107-112. doi: 10.1007/s00484-010-0401-6
- Keller, S., Kohne, S., Notbohm, H. L., Bloch, W., & Schumann, M. (2021). Cooling During Endurance Cycling in the Heat: Blunted Core Temperature but Not Inflammatory Responses. *Int J Sports Physiol Perform*, 16(6), 865-870. doi: 10.1123/ijsp.2020-0509
- Kilian, Y., Engel, F., Wahl, P., Achtzehn, S., Sperlich, B., & Mester, J. (2016). Markers of biological stress in response to a single session of high-intensity interval training and high-volume training in young athletes. *Eur J Appl Physiol*, 116(11-12), 2177-2186. doi: 10.1007/s00421-016-3467-y

- Kitchens, R. L., & Thompson, P. A. (2005). Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res*, 11(4), 225-229. doi: 10.1179/096805105x46565
- Kitchens, R. L., Thompson, P. A., Viriyakosol, S., O'Keefe, G. E., & Munford, R. S. (2001). Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *J Clin Invest*, 108(3), 485-493. doi: 10.1172/jci13139
- Kitchens, R. L., Wolfbauer, G., Albers, J. J., & Munford, R. S. (1999). Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem*, 274(48), 34116-34122. doi: 10.1074/jbc.274.48.34116
- Kraemer, W. J., & Ratamess, N. A. (2005). Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med*, 35(4), 339-361. doi: 10.2165/00007256-200535040-00004
- Krüger, K., & Mooren, F. C. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 13, 37-54.
- Kujala, U. M., Sarna, S., Kaprio, J., & Koskenvuo, M. (1996). Hospital care in later life among former world-class Finnish athletes. *JAMA*, 276(3), 216-220.
- Labrie, F., Luu-The, V., Bélanger, A., Lin, S. X., Simard, J., Pelletier, G., & Labrie, C. (2005). Is dehydroepiandrosterone a hormone? *J Endocrinol*, 187(2), 169-196. doi: 10.1677/joe.1.06264
- Lambert, G. P. (2008). Intestinal barrier dysfunction, endotoxemia, and gastrointestinal symptoms: the 'canary in the coal mine' during exercise-heat stress? *Med Sport Sci*, 53, 61-73. doi: 10.1159/000151550
- Landmann, R., Reber, A. M., Sansano, S., & Zimmerli, W. (1996). Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *J Infect Dis*, 173(3), 661-668. doi: 10.1093/infdis/173.3.661
- Landmann, R., Zimmerli, W., Sansano, S., Link, S., Hahn, A., Glauser, M. P., & Calandra, T. (1995). Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J Infect Dis*, 171(3), 639-644. doi: 10.1093/infdis/171.3.639
- 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 Behav Immun*, 27(1), 54-62. doi: 10.1016/j.bbi.2012.09.006
- Lee, B. J., & Thake, C. D. (2017). Heat and Hypoxic Acclimation Increase Monocyte Heat Shock Protein 72 but Do Not Attenuate Inflammation following Hypoxic Exercise. *Front Physiol*, 8, 811. doi: 10.3389/fphys.2017.00811
- Leiper, J. B. (2015). Fate of ingested fluids: factors affecting gastric emptying and intestinal absorption of beverages in humans. *Nutr Rev*, 73 Suppl 2, 57-72. doi: 10.1093/nutrit/nuv032
- Leon, L. R., & Helwig, B. G. (2010). Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. *J Appl Physiol* (1985), 109(6), 1980-1988. doi: 10.1152/jappphysiol.00301.2010
- Ljungqvist, A., Jenoure, P., Engebretsen, L., Alonso, J. M., Bahr, R., Clough, A., . . . Thill, C. (2009). The International Olympic Committee (IOC) Consensus Statement on periodic health evaluation of elite athletes March 2009. *Br J Sports Med*, 43(9), 631-643. doi: 10.1136/bjism.2009.064394

- MacDonald, H. V., & Pescatello, L. S. (2019). *Exercise and blood pressure control in hypertension Cardiorespiratory fitness in cardiometabolic diseases* (pp. 137-168): Springer.
- Manzini, J. L. (2000). *Declaración de Helsinki: principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos*. *Acta bioethica*, 6(2), 321-334.
- Maughan, R., & Shirreffs, S. (2004). *Exercise in the heat: challenges and opportunities*. *J Sports Sci*, 22(10), 917-927. doi: 10.1080/02640410400005909
- Mendaza, P. L. (1993). *NTP 322: Valoración del riesgo de estrés térmico: índice WBGT. España: Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo*, 1, 1-6.
- Migiano, M. J., Vingren, J. L., Volek, J. S., Maresh, C. M., Fragala, M. S., Ho, J. Y., Thomas, G. A., Hatfield, D. L., Häkkinen, K., Ahtiainen, J., Earp, J. E., & Kraemer, W. J. (2010). *Endocrine response patterns to acute unilateral and bilateral resistance exercise in men*. *J Strength Cond Res*, 24(1), 128-134. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181a92dc5
- Miloski, B., Aoki, M. S., de Freitas, C. G., Schultz de Arruda, A. F., de Moraes, H. S., Drago, G., Borges, T. O., & Moreira, A. (2015). *Does Testosterone Modulate Mood States and Physical Performance in Young Basketball Players?* *J Strength Cond Res*, 29(9), 2474-2481. doi: 10.1519/jsc.0000000000000883
- Minuzzi, L. G., Carvalho, H. M., Brunelli, D. T., Rosado, F., Cavaglieri, C. R., Gonçalves, C. E., . . . Teixeira, A. M. (2017). *Acute Hematological and Inflammatory Responses to High-intensity Exercise Tests: Impact of Duration and Mode of Exercise*. *Int J Sports Med*, 38(7), 551-559. doi: 10.1055/s-0042-117723
- Minuzzi, L. G., Rama, L., Chupel, M. U., Rosado, F., Dos Santos, J. V., Simpson, R., Martinho, A., Paiva, A., & Teixeira, A. M. (2018). *Effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to acute exercise*. *Exerc Immunol Rev*, 24, 72-84.
- Minuzzi, L. G., Teixeira, A. M., & Paiva, A. (2017). *Desporto e envelhecimento ativo: efeitos do treino físico realizado ao longo da vida sobre a imunosenescência em atletas master*. *Universidade de Coimbra (Portugal)*.
- Moran, D. S., Pandolf, K. B., Shapiro, Y., Heled, Y., Shani, Y., Mathew, W. T., & Gonzalez, R. R. (2001). *An environmental stress index (ESI) as a substitute for the wet bulb globe temperature (WBGT)*. *J Therm Biol*, 26(4-5), 427-431.
- Mountjoy, M., Alonso, J. M., Bergeron, M. F., Dvorak, J., Miller, S., Migliorini, S., & Singh, D. G. (2012). *Hyperthermic-related challenges in aquatics, athletics, football, tennis and triathlon*. *Br J Sports Med*, 46(11), 800-804. doi: 10.1136/bjsports-2012-091272
- Munguía-Izquierdo, D., & Legaz-Arrese, A. (2006). *Examining the utility of vo2 peak values to predict performance in elite endurance runners*. *Modern athlete and coach*, 44(1), 3-8.
- Ng, Q. Y., Lee, K. W., Byrne, C., Ho, T. F., & Lim, C. L. (2008). *Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment*. *ANNALS-ACADEMY OF MEDICINE SINGAPORE*, 37(4), 307.
- Nielsen, A. R., & Pedersen, B. K. (2007). *The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15*. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32(5), 833-839. doi: 10.1139/h07-054
- Nieman, D. C. (1994). *Exercise, infection, and immunity*. *Int J Sports Med*, 15 Suppl 3, S131-141. doi: 10.1055/s-2007-1021128

- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., Henson, D. A., Koch, A. J., Butterworth, D. E., Fagoaga, O. R., & Utter, A. (1998). Immune response to exercise training and/or energy restriction in obese women. *Med Sci Sports Exerc*, 30(5), 679-686. doi: 10.1097/00005768-199805000-00006
- NIOSH. (1972). *Occupational Exposure to Hot Environments: US Department of Health, Education and Welfare*.
- Nybo, L., Rasmussen, P., & Sawka, M. N. (2014). Performance in the heat-physiological factors of importance for hyperthermia-induced fatigue. *Compr Physiol*, 4(2), 657-689. doi: 10.1002/cphy.c130012
- Pagana, K. D., & Pagana, T. J. (2003). *Mosby's diagnostic and laboratory test reference (6th edn)*. Philadelphia: Mosby: Elsevier Science.
- Pandolf, K. B. (1998). Time course of heat acclimation and its decay. *Int J Sports Med*, 19 Suppl 2, S157-160. doi: 10.1055/s-2007-971985
- Pandolf, K. B., Sawka, M. N., & Gonzalez, R. R. (1988). *Human performance physiology and environmental medicine at terrestrial extremes: Benchmark Press*.
- Papacosta, E., & Nassis, G. P. (2011). Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. *J Sci Med Sport*, 14(5), 424-434. doi: 10.1016/j.jsams.2011.03.004
- Papacosta, E., Nassis, G. P., & Gleeson, M. (2016). Salivary hormones and anxiety in winners and losers of an international judo competition. *J Sports Sci*, 34(13), 1281-1287. doi: 10.1080/02640414.2015.1111521
- 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. *Exerc Immunol Rev*, 21, 8-25.
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*, 88(4), 1379-1406. doi: 10.1152/physrev.90100.2007
- Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*, 80(3), 1055-1081. doi: 10.1152/physrev.2000.80.3.1055
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., & Schjerling, P. (2001). Exercise and interleukin-6. *Curr Opin Hematol*, 8(3), 137-141. doi: 10.1097/00062752-200105000-00002
- Périard, J. D., Cramer, M. N., Chapman, P. G., Caillaud, C., & Thompson, M. W. (2011). Cardiovascular strain impairs prolonged self-paced exercise in the heat. *Exp Physiol*, 96(2), 134-144. doi: 10.1113/expphysiol.2010.054213
- Périard, J. D., Racinais, S., & Sawka, M. N. (2015). Adaptations and mechanisms of human heat acclimation: Applications for competitive athletes and sports. *Scand J Med Sci Sports*, 25 Suppl 1, 20-38. doi: 10.1111/sms.12408
- Périard, J. D., Travers, G. J. S., Racinais, S., & Sawka, M. N. (2016). Cardiovascular adaptations supporting human exercise-heat acclimation. *Auton Neurosci*, 196, 52-62. doi: 10.1016/j.autneu.2016.02.002
- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98(4), 1154-1162.
- Pryor, J. L., Minson, C. T., & Ferrara, M. S. (2018). Heat acclimation. *Sport and Physical Activity in the Heat*, 33-58.
- Pugin, J., Schürer-Maly, C. C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S. (1993). Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is

- mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(7), 2744-2748. doi: 10.1073/pnas.90.7.2744
- Pyne, D. B., Guy, J. H., & Edwards, A. M. (2014). Managing heat and immune stress in athletes with evidence-based strategies. *Int J Sports Physiol Perform*, 9(5), 744-750. doi: 10.1123/ijspp.2014-0232
- Racinais, S., Périard, J. D., Karlsen, A., & Nybo, L. (2015). Effect of heat and heat acclimatization on cycling time trial performance and pacing. *Med Sci Sports Exerc*, 47(3), 601-606. doi: 10.1249/mss.0000000000000428
- Reihmane, D., & Dela, F. (2014). Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *Eur J Sport Sci*, 14(3), 242-250. doi: 10.1080/17461391.2013.776640
- Rietjens, R., Stone, T. M., Montes, J., Young, J. C., Tandy, R. D., Utz, J. C., & Navalta, J. W. (2015). Moderate intensity resistance training significantly elevates testosterone following upper body and lower body bouts when total volume is held constant. *International Journal of Kinesiology and Sports Science*, 3(4), 50-55.
- Rowell, L. B. (1974). Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiol Rev*, 54(1), 75-159. doi: 10.1152/physrev.1974.54.1.75
- Rowell, L. B. (1986). Thermal Stress. *Human Circulation Regulation During Physical Stress*, 174-212.
- Rowell, L. B., Brengelmann, G. L., Detry, J. M., & Wyss, C. (1971). Venomotor responses to local and remote thermal stimuli to skin in exercising man. *J Appl Physiol*, 30(1), 72-77. doi: 10.1152/jappl.1971.30.1.72
- Rowell, L. B., Marx, H. J., Bruce, R. A., Conn, R. D., & Kusumi, F. (1966). Reductions in cardiac output, central blood volume, and stroke volume with thermal stress in normal men during exercise. *J Clin Invest*, 45(11), 1801-1816. doi: 10.1172/jci105484
- Santos, V. C., Levada-Pires, A. C., Alves, S. R., Pithon-Curi, T. C., Curi, R., & Cury-Boaventura, M. F. (2013). Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. *Cell Biochem Funct*, 31(3), 237-243. doi: 10.1002/cbf.2877
- Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*, 10(3), 170-181. doi: 10.1038/nri2711
- Sarna, S., Sahi, T., Koskenvuo, M., & Kaprio, J. (1993). Increased life expectancy of world class male athletes. *Med Sci Sports Exerc*, 25(2), 237-244.
- Sawka, M. N. (1996). Thermoregulatory responses to acute exercise-heat stress and heat acclimation. *Handbook of Physiology. Environmental Physiology*, 157-185.
- Sawka, M. N., Latzka, W. A., Matott, R. P., & Montain, S. J. (1998). Hydration effects on temperature regulation. *Int J Sports Med*, 19 Suppl 2, S108-110. doi: 10.1055/s-2007-971971
- Sawka, M. N., & Wenger, C. B. (1988). Physiological responses to acute exercise-heat stress: ARMY RESEARCH INST OF ENVIRONMENTAL MEDICINE NATICK MA.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813(5), 878-888. 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. *Semin Immunol*, 26(1), 2-12. doi: 10.1016/j.smim.2013.11.002

- Schett, G., Dayer, J. M., & Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*, 12(1), 14-24. doi: 10.1038/nrrheum.2016.166
- Shephard, R. J. (1998). Immune changes induced by exercise in an adverse environment. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(5), 539-546. doi: 10.1139/cjpp-76-5-539
- Simpson, R. J., 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
- Simpson, R. J., McFarlin, B. K., McSporran, C., Spielmann, G., B. ó. H., & Guy, K. (2009). Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain Behav Immun*, 23(2), 232-239. doi: 10.1016/j.bbi.2008.09.013
- Singh, L. P., Kapoor, M., & Singh, S. B. (2013). Heat: not black, not white. It's gray!!! *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 24(4), 209-224. doi: 10.1515/jbcpp-2012-0080
- Skinner, N. A., MacIsaac, C. M., Hamilton, J. A., & Visvanathan, K. (2005). Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clin Exp Immunol*, 141(2), 270-278. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02839.x
- Snipe, R., Khoo, A., Kitic, C., Gibson, P., & Costa, R. (2018a). Heat stress during prolonged running results in exacerbated intestinal epithelial injury and gastrointestinal symptoms. *European Journal of Applied Physiology*, 118(2), 389-400.
- Snipe, R., Khoo, A., Kitic, C., Gibson, P., & Costa, R. (2018b). Mild Heat stress during prolonged running results in exacerbated intestinal epithelial injury and gastrointestinal symptoms. *International Journal of Sports Medicine*, 39(4), 255-263.
- Steensberg, A., Toft, A. D., Bruunsgaard, H., Sandmand, M., Halkjaer-Kristensen, J., & Pedersen, B. K. (2001). Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *J Appl Physiol* (1985), 91(4), 1708-1712. doi: 10.1152/jappl.2001.91.4.1708
- Stelter, F., Witt, S., Fürll, B., Jack, R. S., Hartung, T., & Schütt, C. (1998). Different efficacy of soluble CD14 treatment in high- and low-dose LPS models. *Eur J Clin Invest*, 28(3), 205-213. doi: 10.1046/j.1365-2362.1998.00264.x
- Suzuki, K. (2018). Cytokine response to exercise and its modulation. *Antioxidants*, 7(1), 17.
- Tamura, Y., Higuchi, Y., Kataoka, M., Akizuki, S., Matsuura, K., & Yamamoto, S. (1999). CD14 transgenic mice expressing membrane and soluble forms: comparisons of levels of cytokines and lethalities in response to lipopolysaccharide between transgenic and non-transgenic mice. *Int Immunol*, 11(3), 333-339. doi: 10.1093/intimm/11.3.333
- 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. *Med Sci Sports Exerc*, 38(2), 293-304. doi: 10.1249/01.mss.0000183479.90501.a0
- Tossige-Gomes, R., Ottone, V. O., Oliveira, P. N., Viana, D. J., Araújo, T. L., Gripp, F. J., & Rocha-Vieira, E. (2014). Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Braz J Med Biol Res*, 47(6), 492-498. doi: 10.1590/1414-431x20143187

- Travers, G., Nichols, D., Riding, N., González-Alonso, J., & Périard, J. D. (2020). Heat Acclimation with Controlled Heart Rate: Influence of Hydration Status. *Med Sci Sports Exerc*, 52(8), 1815-1824. doi: 10.1249/mss.0000000000002320
- Tsai, M. L., Ko, M. H., Chang, C. K., Chou, K. M., & Fang, S. H. (2011). Impact of intense training and rapid weight changes on salivary parameters in elite female Taekwondo athletes. *Scand J Med Sci Sports*, 21(6), 758-764. doi: 10.1111/j.1600-0838.2010.01099.x
- Urhausen, A., Gabriel, H., & Kindermann, W. (1995). Blood hormones as markers of training stress and overtraining. *Sports Med*, 20(4), 251-276. doi: 10.2165/00007256-199520040-00004
- van de Veerdonk, F. L., & Netea, M. G. (2013). New insights in the immunobiology of IL-1 family members. *Frontiers in immunology*, 4, 167.
- Vargas, N. T., & Marino, F. (2014). A neuroinflammatory model for acute fatigue during exercise. *Sports Med*, 44(11), 1479-1487. doi: 10.1007/s40279-014-0232-4
- Vervoorn, C., Quist, A. M., Vermulst, L. J., Erich, W. B., de Vries, W. R., & Thijssen, J. H. (1991). The behaviour of the plasma free testosterone/cortisol ratio during a season of elite rowing training. *Int J Sports Med*, 12(3), 257-263. doi: 10.1055/s-2007-1024677
- Vervoorn, C., Vermulst, L. J., Boelens-Quist, A. M., Koppeschaar, H. P., Erich, W. B., Thijssen, J. H., & de Vries, W. R. (1992). Seasonal changes in performance and free testosterone: cortisol ratio of elite female rowers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 64(1), 14-21. doi: 10.1007/bf00376433
- Vingren, J. L., Kraemer, W. J., Ratamess, N. A., Anderson, J. M., Volek, J. S., & Maresh, C. M. (2010). Testosterone physiology in resistance exercise and training: the upstream regulatory elements. *Sports Med*, 40(12), 1037-1053. doi: 10.2165/11536910-000000000-00000
- Vining, R. F., & McGinley, R. A. (1987). The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *J Steroid Biochem*, 27(1-3), 81-94. doi: 10.1016/0022-4731(87)90297-4
- Vining, R. F., McGinley, R. A., & Symons, R. G. (1983). Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem*, 29(10), 1752-1756.
- Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Woods, J. A., Bishop, N. C., Fleshner, M., Green, C., Pedersen, B. K., Hoffman-Goetz, L., Rogers, C. J., Northoff, H., Abbasi, A., & Simon, P. (2011). Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 17, 6-63.
- Walsh, N. P., & Oliver, S. J. (2016). Exercise, immune function and respiratory infection: An update on the influence of training and environmental stress. *Immunol Cell Biol*, 94(2), 132-139. doi: 10.1038/icb.2015.99
- Walsh, N. P., & Whitham, M. (2006). Exercising in environmental extremes : a greater threat to immune function? *Sports Med*, 36(11), 941-976. doi: 10.2165/00007256-200636110-00003
- Wang, Z., Hu, J., Fan, R., Zhou, J., & Zhong, J. (2012). Association between CD14 gene C-260T polymorphism and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Plos One*, 7(9), e45144. doi: 10.1371/journal.pone.0045144

- Weir, J. B. (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol*, 109(1-2), 1-9. doi: 10.1113/jphysiol.1949.sp004363
- Wenger, C. B., & Roberts, M. F. (1980). Control of forearm venous volume during exercise and body heating. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 48(1), 114-119. doi: 10.1152/jappl.1980.48.1.114
- Willmott, A. G. B., Hayes, M., James, C. A., Dekerle, J., Gibson, O. R., & Maxwell, N. S. (2018). Once- and twice-daily heat acclimation confer similar heat adaptations, inflammatory responses and exercise tolerance improvements. *Physiol Rep*, 6(24), e13936. doi: 10.14814/phy2.13936
- Wong, W., Crane, E. D., Kuo, Y., Kim, A., & Crane, J. D. (2019). The exercise cytokine interleukin-15 rescues slow wound healing in aged mice. *J Biol Chem*, 294(52), 20024-20038. doi: 10.1074/jbc.RA119.010740
- Wonner, R., Wallner, S., Orsó, E., & Schmitz, G. (2018). Effects of acute exercise on monocyte subpopulations in metabolic syndrome patients. *Cytometry B Clin Cytom*, 94(4), 596-605. doi: 10.1002/cyto.b.21387
- Yaglou, C., & Minaed, D. (1957). Control of heat casualties at military training centers. *Arch. Indust. Health*, 16(4), 302-316.
- Zuhl, M., Schneider, S., Lanphere, K., Conn, C., Dokladny, K., & Moseley, P. (2014). Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. *Br J Sports Med*, 48(12), 980-986. doi: 10.1136/bjsports-2012-091585

ANEXOS

The effect of heat acclimation on inflammatory response in athletes: A meta-analysis.

Cascante-Rusenhack, Marcio^{1,2}, Teixeira, Ana Maria ¹, Moncada-Jiménez, José^{2,3}, Silva, Fernanda M.¹, Furmann, Meirielly⁵, Farinha, Carlos¹, Ferreira, José Pedro¹ and Cupido Santos, Amandio Manuel¹

¹University of Coimbra, Faculty of Sport Sciences and Physical Education, Coimbra, PT

²University of Costa Rica Faculty of Education, School of Physical Education and Sports, San José, CR

³University of Costa Rica Faculty of Education, School of Physical Education and Sports, Human Movement Sciences Research Center (CIMOBU), San José, CR

⁴University of Costa Rica, Atlantic Headquarters, Turrialba, CR

⁵Universidade Estadual do Centro-Oeste, Paraná, BR

Address for correspondence

Prof. Marcio Cascante-Rusenhack

Faculty of Sports Science and Physical Education

University of Coimbra

Portugal

E-mail: marcio.cascante@ucr.ac.cr

This study did not receive funding.

Abstract

Heat acclimatization in athletes elicits thermoregulatory adaptations that might enhance physical performance under heat stress and reducing the likelihood of heat-related illnesses. Abundant literature exists regarding the effects of acclimation protocols on the immune response to exercise; however, methodological differences and equivocal findings prevent reaching clear conclusions. **Purpose:** The purpose of the study was to summarize the effect of heat acclimation (HA) on the athletes' inflammatory response to exercise under thermal stress. **Methods:** An aggregate-data meta-analysis was performed by searching and selecting published articles from the electronic databases PubMed, Web of Science, and EBSCOhost. Experimental studies on healthy human adults, published in English, Spanish and Portuguese languages, and reporting at least pre-and post- measures of inflammatory biomarkers were included. The random-effects model was used to calculate effect sizes (ES). **Results:** Five studies were included (n = 9 ESs), representing 45 male participants. The overall ES on inflammatory biomarkers was moderate and significant following a HA protocol (ES=-0.57 ± 0.20, p=0.041, 95%CI=-0.97, -0.16). This finding was consistent across studies and moderator analysis showed that HA protocols as short as five days attenuated the immune response to exercise performed under heat stress conditions (ES=0.49 ± 0.22, p=0.025, 95%CI=0.06, 0.03). **Conclusion:** A reduction in the inflammatory response was observed following a HA protocol of at least five days before performing exercise in a heat-stress environment. **Keywords:** meta-analysis, heat acclimation, inflammatory, immune, performance, biomarkers.

Introduction

Athletes in a plethora of sports train and compete in environments that potentially pose a risk to their health and physical performance. In particular, athletes competing in outdoor sports during summer may be exposed to high thermal stress comprised of a combination of elevated ambient temperature and humidity during training and competition (Pyne et al., 2014). Several major sporting events such as the 2014 FIFA World Cup and the 2016 Olympic Games held in Brazil and the Cricket World Cup 2015 held in Australia and New Zealand were performed in high thermal stress environments (e.g., 27°C to 28°C, 68% humidity) (McCarthy, 2014). Other events such as the Olympic Games Tokyo 2021 and the 2022 FIFA World Cup in Qatar will be played during potentially hot and humid environmental conditions that might reach between 24°C to 38°C (Guy, Deakin, Edwards, Miller, & Pyne, 2015; Leberfinger, 2015).

Sports events performed in hot and humid environmental conditions represent an extraordinary environmental challenge for athletes to maintain an ideal performance (Ely, Chevront, Roberts, & Montain, 2007). Submaximal exercises performed in hot environmental conditions defy the cardiovascular system by requiring a sustained response to meet the thermoregulatory demands without compromising the metabolic and circulatory demands. Thermoregulation can be compromised during prolonged submaximal exercise due to concurrent circulatory and metabolic requirements that result in an increase in core temperature (CT) and associated fatigue (Guy et al., 2015; Pyne et al., 2014; Racinais et al., 2012). Indeed, a prolonged exposure to heat impairs physical performance compared to colder conditions (Aldous et al., 2019; Bergeron, 2019; Drust, Rasmussen, Mohr, Nielsen, & Nybo, 2005; Maughan & Shirreffs, 2004).

International sports federations responsible for athletes performing outdoors and generally in hot conditions are aware of the health risks associated with environmental conditions. These organizations have implemented measures to increase the awareness and well-being of their athletes (BBC Sport, 2014; Mountjoy et al., 2012). However, even if the federations and athletes take measures, the effects of acute and chronic exposure to heat and humidity during training and competition can have a significant impact upon thermoregulation. Therefore, an uncontrolled alteration of metabolic function will lead to health deterioration and adverse consequences on physical performance (Ng, Lee, Byrne, Ho, & Lim, 2008).

The classic thermoregulation model is based on the equation of thermal equilibrium related to heat production during exercise or physical activity (PA) through different mechanisms of heat dissipation (i.e., evaporation, conduction, convection, and radiation). The magnitude of the hyperthermic response elicited by environmental conditions and PA or exercise has been considered as the main cause of heat-related diseases. These include heat cramps, heat syncope, heat exhaustion, and, in some cases, heat stroke due to a dysfunction of the central nervous system, which could affect the coagulation cascade leading to multiple organ failure and death (Singh & Kapoor, 2013). Therefore, heat stress causes a wide variety, from tissue to molecular level, of thermoregulatory, immune, inflammatory, and neuromuscular responses (Pyne et al., 2014).

The effects of exercise on the immune system during training and competition under thermal stress have been studied before (Barberio et al., 2015; Costello et al., 2018; Kanikowska et al., 2012; Lee & Thake, 2017; Walsh & Oliver, 2016; Walsh & Whitham, 2006). A myriad of acute alterations in immune markers have been reported; however, the evidence suggests that immunity is unlikely chronically impaired. David

Pyne et al. (2014), found that exercising in a moderate to hot environment elicits a modest increase in the circulating concentrations of natural killer (NK) cells. Gill et al. (2015), found that compared to baseline, participants completing an ultra-marathon exponentially increased the percentage of proinflammatory cytokines in the blood. For instance, the TNF- α concentration increased more than 150% in the 5th stage of the competition and the C-reactive protein 889% in the 3rd stage.

The inflammatory response to exercise is transient under normal conditions and decreases rapidly as homeostasis is restored; however, more proinflammatory cytokines are released as the exercise duration and intensity increases, which might induce undesirable health and physical performance consequences to athletes (Gill, et al., 2015). Recent evidence suggests that thermal stress can also occur when thermoregulation is compromised by circulatory and metabolic demands that lead to systemic inflammation (Epstein & Roberts, 2011; Gill, et al., 2015; Lambert, 2008; Leon & Helwig, 2010).

There is abundant literature on the health and physical performance consequences of exercising under thermal stress, as well as the effects of heat acclimation in athletes aimed at mitigating those consequences. The purpose of the study was to summarize the effect of heat acclimation on the athlete's inflammatory response to exercise under thermal stress.

Methods

The present aggregate-data meta-analysis followed procedures suggested by Borenstein, Hedges, Higgins, and Rothstein (2009) and Moher, Liberati, Tetzlaff, and Altman (2009).

Information sources and search strategy

ANEXO I

The literature search for potential studies was performed in March 2019. The electronic databases searched were PubMed, Web of Science, and EBSCOhost (including several other databases such as Medline, Sport Discuss, and Academic Search Complete). The reference list from selected articles were reviewed for potential eligible studies. The first order search terms used were 'acclimation', 'heat acclimation', 'acclimatation' and 'acclimatization' and these were used in combination with the following second order search terms: 'heat', 'heat stress', 'exercise', 'performance', 'training', 'inflammatory', 'immune system', 'immunology', and 'cytokines'.

Eligibility criteria and study selection

Studies were meta-analyzed if they met the following inclusion criteria: a) experimental studies, b) performed acute and chronic exercise, c) studies involving human healthy adults, d) articles published in English, Spanish and Portuguese languages, e) studies reporting at least the mean, standard deviation (SD), and sample size, and f) articles published in peer-reviewed journals. Studies were excluded if they were: a) abstracts without statistical data necessary to complete the meta-analysis, b) thesis and dissertations, c) animal studies, d) studies published in languages other than English, Spanish, and Portuguese, and e) studies related to heat stress in non-athletic settings. The authors selected and retrieved the information from the individual articles. Disagreements as to whether include or exclude an article was solved by consensus.

Data collection process

The following information was extracted from the selected studies and coded into the Comprehensive Meta-Analysis software, version 3.0 (Bax, Yu, Ikeda, & Moons, 2007): a) study design, b) study quality in a scale from 0 to 5 (i.e., randomization, correct allocation of randomization, control group, pre- and post-measurements, description of experimental death, sample size), c) participant's

characteristics (i.e., age, gender, fitness level), d) characteristics of the treatment (i.e., exercise type, modality, duration), 3) mean, SD and sample size. When a standard error or interquartile range were reported, these were converted to SD (Hozo, Djulbegovic, & Hozo, 2005).

Risk of bias

The risk of bias was assessed based on a list of items such as eligibility criteria specified, randomization specified, groups similar at baseline, report of adverse events, exercise attendance reported, and between-group statistical comparisons reported for the main outcome variable (Smart et al., 2015).

Summary measures

The primary outcomes were immune biomarkers, and a within-group effect size (ES) was computed from a standardized mean difference (SMD) according to Borenstein et al. (2009).

Heterogeneity and small-study effects

Cochran's Q test, I^2 and T^2 statistics were used to assess heterogeneity and inconsistency across included studies (Borenstein et al., 2009). The Q statistic was tested at $p < 0.10$ and the I^2 values were considered very low ($< 25\%$), low (25 to $< 50\%$), moderate (50 to $< 75\%$), and large ($> 75\%$). $T^2 > 1$ suggests the presence of substantial statistical heterogeneity. The influence of small-study effects was determined by visual inspection of a funnel plot and Egger's regression (Egger, Smith, Schneider, & Minder, 1997; Sedgwick & Marston, 2015; Sterne, Egger, & Smith, 2001).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Comprehensive Meta-Analysis software, version 3.0 (Bax et al., 2007). The overall ES of the studies were computed

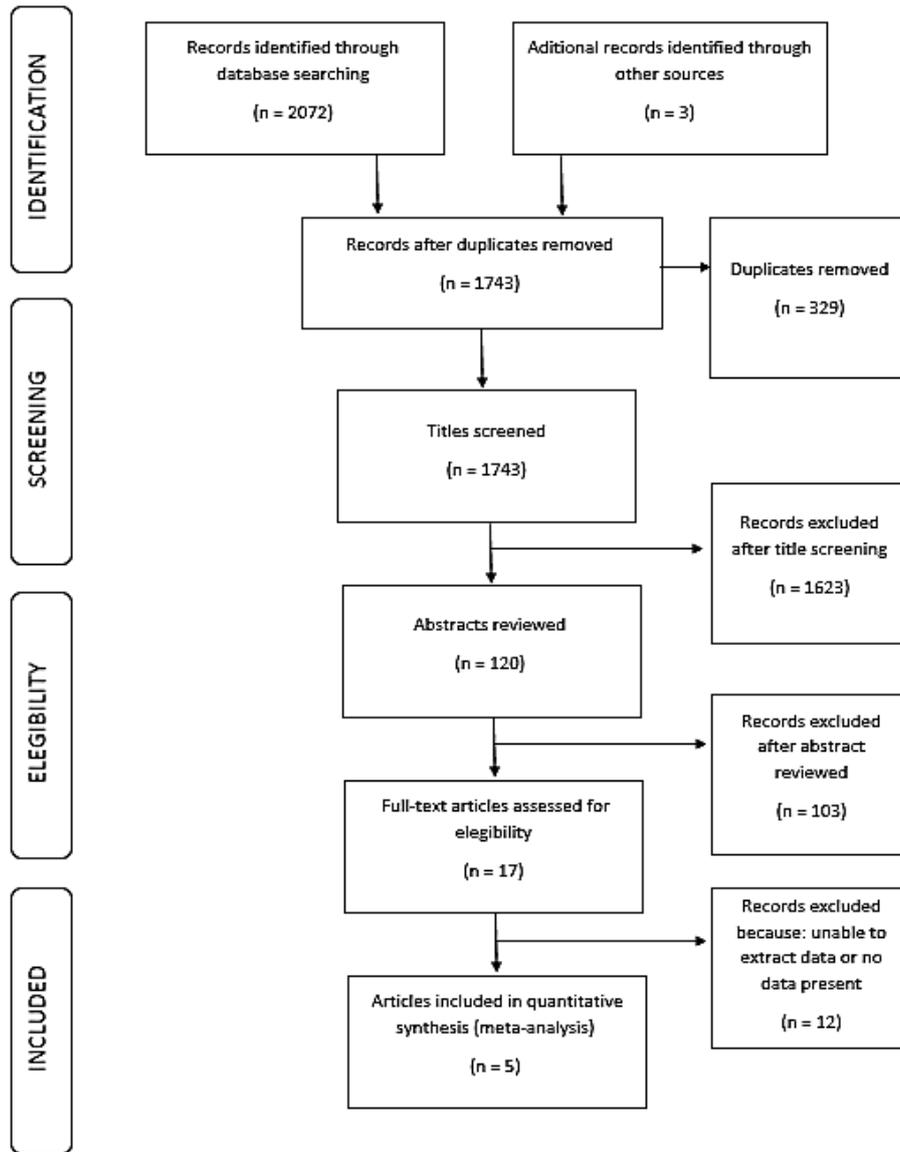
following the random effects model (DerSimonian & Kacker, 2007; DerSimonian & Laird, 1986). Descriptive statistics are presented as mean and SD, unless otherwise noted. For inferential analysis, statistical significance was set *a priori* at $p < 0.05$ (Batterham & Hopkins, 2006). The 95%CI were computed to determine whether the ES was statistically significant between groups (i.e., control vs. experimental). The ESs were evaluated and interpreted as suggested by Cohen (1992).

Results

The PRISMA flowchart used for the search and selection of the articles included in this meta-analysis is shown in figure 1 (Moher et al., 2009). Five studies were included in the meta-analysis from an initial search of 2072 studies.

Figure 1. Study search and selection flowchart (Moher et al., 2009).

ANEXO I



The participant's descriptive statistics and information regarding the HA protocol and biomarkers is presented in table 1. All subjects were males, mostly trained, and the only common immunological marker in all the manuscripts was IL-6.

Table 1. Descriptive statistics of the participants.

Reference	N	Age (M ± SD)	Training status	Consecutive days	Sport modality	Immune biomarkers
Barberio et al. (2015)	9	24 ± 3	Yes	Yes	Endurance	IL-6, IL-10
Costello et al. (2018)	8	21 ± 3	Yes	No	Cyclists	IL-6
Hailes, Slivka, Cuddy, and Ruby (2011)	15	25 ± 4	Yes	Yes	-	IL-6, IL-10
Kanikowska et al. (2012)	6	23 ± 2.8	-	-	-	IL-6, TNF- α
* Lee and Thake (2017)	7	22 ± 5	-	-	-	IL-6, IL-10, TNF- α
Total	45	23 ± 3.7	-	-	-	-

* The study recruited 21 subjects, but only seven had heat acclimatization.

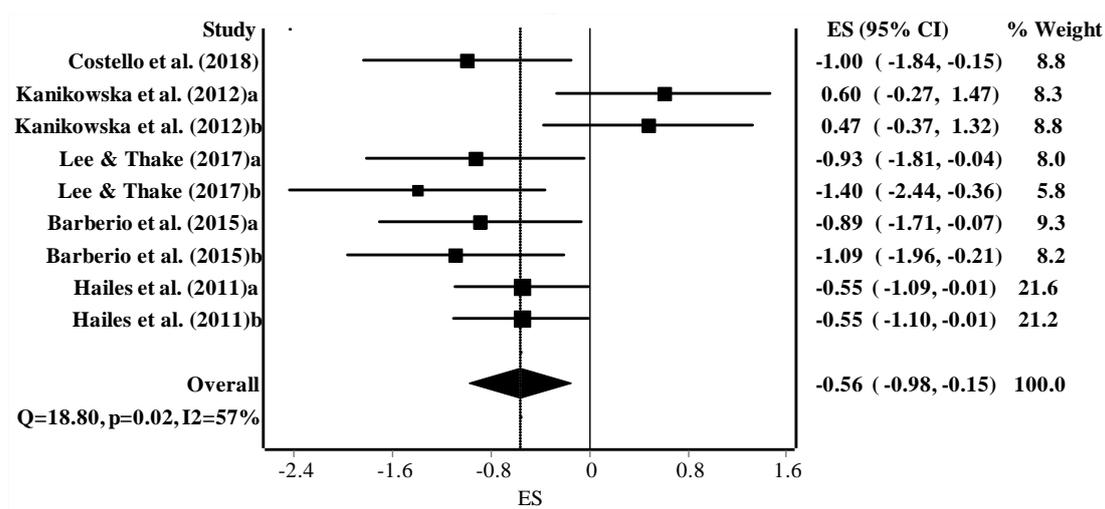
Despite only five studies being included in this meta-analysis, there were nine different entries because four studies reported more than one inflammatory biomarker.

Magnitude of the effect size

The overall effect on the inflammatory response was statistically significant from pre- to post-HA protocols (ES = -0.57 ± 0.20 ; 95% CI = $-0.97, -0.16$; $p = 0.041$). Therefore, HA decreased the effects of exercise performed under heat stress on the inflammatory response by more than 50%. The ES and confidence intervals are presented in figure 2.

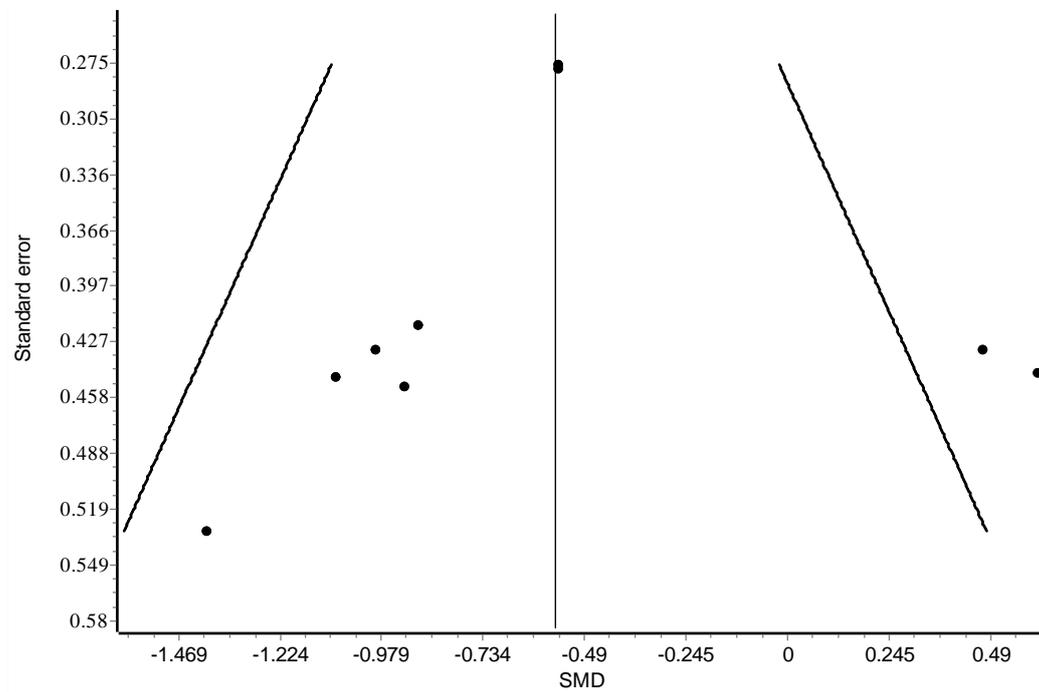
Figure 2. Effect size and confidence intervals of the meta-analyzed studies.

ANEXO I



The Q statistic provides the possibility of testing the null hypothesis that all the studies in the analysis share magnitude of the common ES. In this study, $Q = 18.79$, $p = 0.016$; therefore, the null hypothesis was rejected; the true ES varied from all studies. In this study, $Z = -2.82$, $p < 0.05$; therefore, there is a significant effect of HA on inflammatory biomarkers. This effect partially mitigates the health consequences of exercise in adverse thermal stress conditions. The $I^2 = 57.43$ was moderate; thus, about 57% of the changes in the variance are true effects caused by HA. There was no publication bias as determined by the funnel plot (Figure 3). Although few studies were included in the present meta-analysis, the Egger's test confirmed the absence of publication bias (Egger's = 0.42, $p = 0.325$).

Moderator analysis on the number of days of acclimation (i.e., number of days an athlete was subject to HA), showed an $ES = 0.49 \pm 0.22$, $p = 0.025$, $95\%CI = 0.06, 0.03$. After five days of acclimatization, which were the lowest number of acclimation days reported in the studies included in this meta-analysis, there was already a significant and positive effect on the athletes' inflammatory responses. When testing the null hypothesis for the ES including this moderator variable, the value of $Q = 0.37$ ($p = 0.543$), thus, this ES is true and varies between studies.

Figure 3. Funnel plot for the entries in the meta-analysis.

Discussion

This study aimed to determine the global effect size of HA protocols on the inflammatory response in athletes exercising under elevated conditions of thermal stress. A second aim was to identify moderator variables of the treatment effect. The main result of this meta-analysis was a significant decrease in the inflammatory response following a HA protocol of at least five days before performing exercise under heat stress. The reduction in the inflammatory response was higher than 50% and of moderate magnitude (Cohen, 1988).

There is evidence suggesting that exercising in ambient conditions of thermal stress can increase the body inflammatory responses (Hailes et al., 2011; Magalhaes et al., 2010; Walsh & Oliver, 2016; Willmott et al., 2018), and consequently, elicit a reduction in physical performance and a deterioration of the athlete's health. The reduction in the immuno-inflammatory response following a protocol of HA found in

the present meta-analysis is relevant to the athletes since any improvement in their health means a better quality of life, lower expenses in medical care, as well as the absence of symptoms that can prevent them from training or competing. In addition, athletes might maintain high physical performance during extended periods, can participate in a greater number of competitions, and might recovery faster as their immune response is enhanced, or at least, maintained.

Research on the effects of HA protocols on the body's inflammatory response following exercising under thermal stress has shown improvements on the immune response (Barberio et al., 2015; Costello et al., 2018; Guy, Pyne, Deakin, Miller, & Edwards, 2016; Hailes et al., 2011; Kanikowska et al., 2012; Lee & Thake, 2017; Walsh & Oliver, 2016). A HA protocol might allow decreasing the inflammatory response and a possible deterioration in the health; which further allows athletes to perform in environmental conditions in which they are accustomed to train or compete.

Based on the analysis of the moderator variable, it was possible to determine that following five days of a HA protocol, the athletes are already acclimatized enough to achieve a reduction close to 50% in the acute immuno-inflammatory response. This type of protocol carried out during such a short period will not affect an athlete's training regimen or performance prior to competition.

Guy et al. (2016), studied 24 moderately trained subjects, who were assigned to a non-exercise control group and two experimental exercise groups. The experimental groups were named "neutral" (i.e., 20 °C and 45% Relative Humidity) and "hot" (i.e., 35 °C and 70% Relative Humidity) and trained for 18 days. The participants in the three groups underwent physical performance and inflammatory immune response tests for three days under heat stress conditions. The participants in the three groups showed similar inflammatory responses following the experiment. The participants in the

“neutral” and “hot” groups showed similar improvements in physical performance on the second day; however, on the third day of testing, only the participants in the “hot” group showed additional physical performance improvements. These findings suggest that the improvements shown by the experimental groups on the second day are likely explained solely to the physical training received during HA and that the additional improvement shown by the “hot” group on the third day is explained by the stimuli received by the environmental conditions of the HA protocol.

Prolonged elevation of inflammatory cytokines can signify cumulative fatigue, overtraining, lack of sleep, or a neuroinflammatory response (Vargas & Marino, 2014). Few studies have investigated the effects of heat acclimatization on biomarkers of inflammation. Although the plasma concentration of several other cytokines can be affected by exercise, IL-6 increases more dramatically than any other (Costello et al., 2018; Fischer, 2006). The IL-6 can be released into the circulation after various non-pathological (e.g., exercise) as well as pathological (e.g., trauma, sepsis, thermal injury) events. According to previous evidence, there may be differences related to the magnitude of the increase in IL-6 concentration in athletes undergoing heat stress conditions without having completed a previous HA protocol. For example, Costello et al. (2018), indicated that the acute effect of exercise in the heat in athletes without HA caused the level of IL-6 to increase twice. Similarly, Guy et al. (2017), reported that the greatest acute change in IL-6 after exercising under heat stress conditions without having HA was 4 times greater than at rest. Therefore, regardless of the magnitude of the change in IL-6, it is clear that the trend is always to increase. After participating in an HA protocol, the concentration of IL-10 (an anti-inflammatory cytokine) also showed changes compared to its previous values, presenting higher post-exercise concentrations, both on the first day and after five days of acclimatization (Barberio et

al., 2015). According to Hailes et al. (2011), IL-10 values between rest days remained similar, but pre-exercise concentrations were significantly higher after acclimatization. This increased basal response could be protective by acting as a ready system better able to respond to the next episode of hyperthermia.

The findings by Costello et al., (2018) and Guy et al. (2017), suggest that there were no chronic inflammatory effects in HA processes that may or may not have allowed hydration. This is supported by finding that IL-6 levels return to baseline before each day participants attended the laboratory to perform the corresponding tests. This fact confirms the aforementioned, that a short HA process will not affect the physical performance level of athletes and will allow them to maintain their immune system functionality. However, this inflammatory response appears to be appropriate to a stressor, or indeed, to combined stressors (i.e., heat, exercise, dehydration) (Costello et al., 2018; Wolkow et al., 2015), as long as it is maintained the duration and intensity of exercise during the HA process since by increasing any of these variables there will be a high probability that the inflammatory response will also increase (Huldani et al., 2020). The number of sessions is also a variable to consider when designing a HA protocol for athletes; according to Guy et al. (2016), more than seven sessions of HA can induce more substantial physiological adaptations and improvements in performance, but it is also possible that this increase triggers systemic inflammation, which remains to be elucidated.

Conclusion

A HA protocol strategy serves to accustom athletes and other people exercising in ambient conditions to which they are not accustomed (i.e., thermal stress). A short-term HA protocol of five days might reduce by about 50% of the inflammatory processes that occurred in the body during the practice of exercise or sport in conditions

ANEXO I

of thermal stress. Since the inflammatory processes are reduced following a period of acclimatization, the body maintains homeostasis, and the athletes might perform to the best of their abilities during competitions in harsh ambient conditions, as well as maintain a better post-training and competition health.

References

- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *119*(3), 651-665.
- Aldous, J. W. F., Christmas, B. C. R., Akubat, I., Stringer, C. A., Abt, G., & Taylor, L. (2019). Mixed-methods pre-match cooling improves simulated soccer performance in the heat. *European Journal of Sport Science*, *19*(2), 156-165.
- 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. *J Sports Sci*, *26*(6), 653-661.
- Aragón-Vargas, L. F., Moncada-Jiménez, J., Hernández-Elizondo, J., Barrenechea, A., & Monge-Alvarado, M. (2009). Evaluation of pre-game hydration status, heat stress, and fluid balance during professional soccer competition in the heat. *European Journal of Sport Science*, *9*(5), 269-276.
- Armstrong, L. E., Ganio, M., Casa, Douglas J., Lee, EC., McDermott, BP, Klau, J. F., Jimenez, L., Le Bellego, L., Chevillotte, E., & Lieberman, H. R. (2012). Mild dehydration affects mood in healthy young women. *J Nutr*, *142*(2), 382-388.
- Armstrong, L. (1998). Heat acclimatization. *Encyclopedia of sports medicine and science*.
- Armstrong, L., & Maresh, C. (1991). The induction and decay of heat acclimatisation in trained athletes. *Sports Medicine*, *12*(5), 302-312.
- Arosa, F. A., Cardoso, E. M., & Pacheco, F. C. (2012). *Fundamentos de imunologia*.
- Arruda, A. F., Aoki, M. S., Freitas, C. G., Spigolon, L. M., Franciscan, C., & Moreira, A. (2015). Testosterone concentration and lower limb power over an entire competitive season in elite young soccer players. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, *29*(12), 3380-3385.
- Balducci, S., Zanuso, S., Nicolucci, A., De Feo, P., Cavallo, S., Cardelli, P., Fallucca, S, Alessi, E., Fallucca, F., & Pugliese, G. (2010). Effect of an intensive exercise intervention strategy on modifiable cardiovascular risk factors in subjects with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial: the Italian Diabetes and Exercise Study (IDES). *Archives of internal medicine*, *170*(20), 1794-1803.
- Banchereau, J., Pascual, V., & O'garra, A. (2012). From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nature immunology*, *13*(10), 925-931.
- Barberio, M. D., Elmer, D. J., Laird, R. H., Lee, K. A., Gladden, B., & Pascoe, D. D. (2015). Systemic LPS and Inflammatory Response during Consecutive Days of Exercise in Heat. *International Journal of Sports Medicine*, *36*(3), 262-270. doi: 10.1055/s-0034-1389904
- Batterham, A. M., & Hopkins, W. G. (2006). Making meaningful inferences about magnitudes. *Int J Sports Physiol Perform*, *1*(1), 50-57.
- Bax, L., Yu, L.-M., Ikeda, N., & Moons, K. G. (2007). A systematic comparison of software dedicated to meta-analysis of causal studies. *BMC medical research methodology*, *7*(1), 40.
- BBC Sport. (2014). World Cup 2014: Heat forces first cooling breaks in Brazil Retrieved August 19th, 2019, from <https://www.bbc.com/sport/football/28075216>
- Belge, K.-U., Dayyani, F., Horelt, A., Siedlar, M., Frankenberger, M., Frankenberger, B., Espevik, T., & Ziegler-Heitbrock, L. (2002). The proinflammatory CD14+ CD16+

- DR++ monocytes are a major source of TNF. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3536-3542.
- Bergeron, M. F. (2019). Tennis in the Heat *Heat Stress in Sport and Exercise* (pp. 219-234): Springer.
- Bishop, N. C. (2013). Effects of exercise on acquired immune function. *Exercise Immunology*, 126-157.
- Borenstein, M., Hedges, L. V., Higgins, J. P. T., & Rothstein, H. R. (2009). *Introduction to Meta-Analysis*. UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Borg, G. (1998). *Borg's perceived exertion and pain scales*: Human kinetics.
- Bosenberg, A., Brock-Utne, J., Gaffin, S., Wells, M., & Blake, G. (1988). Strenuous exercise causes systemic endotoxemia. *Journal of Applied Physiology*, 65(1), 106-108.
- Brock-Utne, J., Gaffin, S., Wells, M., Gathiram, P., Sohar, E., James, M., Morrell, D., & Norman, R. (1988). Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race. *South African Medical Journal*, 73(9), 533-536.
- Brolinson, P. G., & Elliott, D. (2007). Exercise and the immune system. *Clinics in sports medicine*, 26(3), 311-319.
- Burgmann, H., Winkler, S., Locker, Gottfried J., Presterl, Elisabeth, Laczika, K., Staudinger, Thomas, Knapp, S., Thalhammer, Florian, Wenisch, C., & Zedwitz-Liebenstein, K. (1996). Increased serum concentration of soluble CD14 is a prognostic marker in gram-positive sepsis. *Clinical immunology and immunopathology*, 80(3), 307-310.
- Campbell, D., & Stanley, J. (1963). Experimental and quasi-experimental designs for research. *Chicago, Rand Mc. Nally*.
- Campbell, D., & Stanley, J. (1970). *Diseños experimentales y cuasiexperimentales*: Amorrortu: Buenos Aires.
- Camus, G., Nys, M., Poortmans, J., Venneman, I., Monfils, T., Deby-Dupont, G, Juchmes-Ferir, A., Deby, C., Lamy, M., & Duchateau, J. (1998). Endotoxaemia, production of tumour necrosis factor α and polymorphonuclear neutrophil activation following strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 79(1), 62-68.
- Camus, G., Poortmans, J., Nys, M., Deby-Dupont, G., Duchateau, J., Deby, C., & Lamy, M. (1997). Mild endotoxaemia and the inflammatory response induced by a marathon race. *Clinical Science*, 92(4), 415-422.
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral sciences*. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, Publicshers.
- Cohen, J. (1992). A power primer. *Psychological Bulletin*, 112, 155-159. doi: 10.1037//0033-2909.112.1.155
- Corazza, D. I., Sebastião, É., Pedroso, R. V., Andreatto, C. A. A., de Melo Coelho, F. G., Gobbi, S., Teodorov, Elizabeth, & Santos-Galduróz, R. F. (2014). Influence of chronic exercise on serum cortisol levels in older adults. *European Review of Aging and Physical Activity*, 11(1), 25-34.
- Costa, R. J., Gaskell, S. K., McCubbin, A. J., & Snipe, R. M. (2020). Exertional-heat stress-associated gastrointestinal perturbations during Olympic sports: Management strategies for athletes preparing and competing in the 2020 Tokyo Olympic Games. *Temperature*, 7(1), 58-88.
- Costello, J. T., Rendell, R. A., Furber, M., Massey, H. C., Tipton, M. J., Young, J. S., & Corbett, J. (2018). Effects of acute or chronic heat exposure, exercise and

- dehydration on plasma cortisol, IL-6 and CRP levels in trained males. *Cytokine*, *110*, 277-283. doi: 10.1016/j.cyto.2018.01.018
- Cújar-Vertel, A. D. C., & Julio-Espitia, G. P. (2016). Evaluación de las condiciones térmicas ambientales del área de producción en una panadería en Cereté (Córdoba). *Entramado*, *12*(1), 332-343.
- de Gonzalo-Calvo, D., Neitzert, K., Fernández, M., Vega-Naredo, I., Caballero, B., García-Macía, M., Suárez, F., Rodríguez-Colunga, M., Solano, J., & Coto-Montes, A. (2010). Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- α and IL-6 as possible biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(5), 733-737.
- DerSimonian, R., & Kacker, R. (2007). Random-effects model for meta-analysis of clinical trials: an update. *Contemporary clinical trials*, *28*(2), 105-114. doi: 10.1016/j.cct.2006.04.004
- DerSimonian, R., & Laird, N. (1986). Meta-analysis in clinical trials. *Controlled clinical trials*, *7*(3), 177-188. doi: 10.1016/0197-2456(86)90046-2
- 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*, *37*(2), 247-248.
- Dinarello, C. A. (2011). A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *European Journal of Immunology*, *41*(5), 1203-1217. doi: <https://doi.org/10.1002/eji.201141550>
- Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O'Neill, L., Goldbach-Mansky, R., Pizarro, T., Hoffman, H., & Bufler, P. (2010). IL-1 family nomenclature. *Nature immunology*, *11*(11), 973-973.
- Drust, B., Rasmussen, P., Mohr, M., Nielsen, B., & Nybo, L. (2005). Elevations in core and muscle temperature impairs repeated sprint performance. *Acta Physiol Scand*, *183*(2), 181-190.
- Egger, M., Smith, G. D., Schneider, M., & Minder, C. (1997). Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *Bmj*, *315*(7109), 629-634.
- Ely, M. R., Chevront, S. N., Roberts, W. O., & Montain, S. J. (2007). Impact of weather on marathon-running performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *39*(3), 487-493.
- Epstein, Y., & Roberts, W. O. (2011). The pathophysiology of heat stroke: an integrative view of the final common pathway. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *21*(6), 742-748. doi: 10.1111/j.1600-0838.2011.01333.x
- Eskandari, A., Fashi, M., Saeidi, Ayoub, Boullosa, D., Laher, I., Ben Abderrahman, A., Jabbour, G., & Zouhal, H. (2020). Resistance exercise in a hot environment alters serum markers in untrained males. *Frontiers in Physiology*, *11*, 597.
- Fingerle-Rowson, G., Angstwurm, M., Andreesen, R., & Ziegler-Heitbrock, H. (1998). Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clinical & Experimental Immunology*, *112*(3), 501-506.
- Fischer, C. P. (2006). Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. *Exerc immunol rev*, *12*(6-33), 41.
- Francesconi, R. P., Hubbard, R. W., Askew, E. W., & Armstrong, L. (1993). Responses of soldiers to 4-gram and 8-gram NaCl diets during 10 days of heat acclimation. *Nutritional Needs in Hot Environments: Applications for Military Personnel in Field Operations*, 247.

- Frey, E., Miller, D., Jahr, T Gullstein, Sundan, A., Bazil, V., Espevik, T, Finlay, B. B., & Wright, S. (1992). Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*, 176(6), 1665-1671.
- Fry, A. C., & Kraemer, W. J. (1997). Resistance exercise overtraining and overreaching. *Sports Medicine*, 23(2), 106-129.
- Fry, A. C., Kraemer, W. J., & Ramsey, L. T. (1998). Pituitary-adrenal-gonadal responses to high-intensity resistance exercise overtraining. *Journal of Applied Physiology*, 85(6), 2352-2359.
- Fujio, K., Okamura, T., & Yamamoto, K. (2010). The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells. *Advances in immunology*, 105, 99-130.
- Ganio, M. S., Armstrong, L., Casa, DJ., McDermott, BP., , Lee, E. C., Yamamoto, L., Marzano, Stefania, Lopez, R. M., Jimenez, L., & Le Bellego, L. (2011). Mild dehydration impairs cognitive performance and mood of men. *British Journal of Nutrition*, 106(10), 1535-1543.
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018.
- Gatti, R., & De Palo, E. (2011). An update: salivary hormones and physical exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 21(2), 157-169.
- Gaviglio, C. M., Osborne, M., Kelly, V. G., Kilduff, L. P., & Cook, C. J. (2015). Salivary testosterone and cortisol responses to four different rugby training exercise protocols. *European Journal of Sport Science*, 15(6), 497-504.
- Gill, S. K., Teixeira, A., Rama, L., Rosado, F., , Hankey, J., Scheer, V., Hemmings, K., Ansley-Robson, P., & Costa, R. (2015). Circulatory endotoxin concentration and cytokine profile in response to exertional-heat stress during a multi-stage ultra-marathon competition. *Exercise Immunology Review*, 21, 114-128.
- Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*, 103(2), 693-699.
- Gleeson., M., Bishop, N. C., Stensel, D. J., Lindley, M. R., Mastana, S. S., & Nimmo, M. A. (2011). The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(9), 607-615. doi: 10.1038/nri3041
- Gonzalez-Alonso, J., Mora-Rodriguez, R., Below, P., & Coyle, E. (1995). Dehydration reduces cardiac output and increases systemic and cutaneous vascular resistance during exercise. *Journal of Applied Physiology*, 79(5), 1487-1496.
- González-Alonso, J., Teller, C., Andersen, S. L., Jensen, F. B., Hyldig, T., & Nielsen, B. (1999). Influence of body temperature on the development of fatigue during prolonged exercise in the heat. *Journal of Applied Physiology*, 86(3), 1032-1039.
- González-Alonso, J., Crandall, C. G., & Johnson, J. M. (2008). The cardiovascular challenge of exercising in the heat. *J Physiol*, 586(1), 45-53.
- Gregori, S., Tomasoni, D., Pacciani, V., Scirpoli, M., Battaglia, M., Magnani, C. F., Hauben, E., & Roncarolo, M.-G. (2010). Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(6), 935-944.
- Guy, J. H., Deakin, G. B., Edwards, A. M., Miller, C. M., & Pyne, D. B. (2015). Adaptation to hot environmental conditions: an exploration of the performance basis, procedures and future directions to optimise opportunities for elite athletes. *Sports Med*, 45(3), 303-311. doi: 10.1007/s40279-014-0277-4

- Guy, J. H., Edwards, A. M., Miller, C. M., Deakin, G. B., & Pyne, D. B. (2017). Short-term reliability of inflammatory mediators and response to exercise in the heat. *J Sports Sci*, 35(16), 1622-1628. doi: 10.1080/02640414.2016.1227464
- Guy, J. H., Pyne, D. B., Deakin, G. B., Miller, C. M., & Edwards, A. M. (2016). Acclimation Training Improves Endurance Cycling Performance in the Heat without Inducing Endotoxemia. *Frontiers in Physiology*, 7(318), 1-9. doi: 10.3389/fphys.2016.00318
- Hailes, W. S., Slivka, D., Cuddy, J., & Ruby, B. C. (2011). Human plasma inflammatory response during 5 days of exercise training in the heat. *J Therm Biol*, 36(5), 277-282. doi: 10.1016/j.jtherbio.2011.03.013
- Hailman, E., Vasselon, Thierry, Kelley, M., Busse, Leigh A, Hu, M., Lichenstein, H. S., Detmers, P. A., & Wright, S. D. (1996). Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. *The Journal of Immunology*, 156(11), 4384-4390.
- 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*, 45(5), 713-726.
- Hayes, L. D., Grace, F. M., Sculthorpe, N., Herbert, P., Ratcliffe, J., Kilduff, L., & Baker, J. S. (2013). The effects of a formal exercise training programme on salivary hormone concentrations and body composition in previously sedentary aging men. *Springerplus*, 2(1), 1-5.
- Hayes, L. D., Sculthorpe, N., Young, J. D., Baker, J. S., & Grace, F. M. (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*, 70(4), 991-996.
- Haziot, A., Rong, G. W., Lin, X.-Y., Silver, J., & Goyert, S. M. (1995). Recombinant soluble CD14 prevents mortality in mice treated with endotoxin (lipopolysaccharide). *The Journal of Immunology*, 154(12), 6529-6532.
- Heled, Y., Fleischmann, C., & Epstein, Y. (2013). Cytokines and their role in hyperthermia and heat stroke. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 24(2), 85-96.
- Hill, E., Zack, E., Battaglini, C., Viru, M., Viru, A., & Hackney, A. (2008). Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect. *Journal of endocrinological investigation*, 31(7), 587-591.
- Hoffman-Goetz, L., & Pedersen, B. K. (1994). Exercise and the immune system: a model of the stress response? *Immunology today*, 15(8), 382-387.
- Hori, S. (1995). Adaptation to heat. *Jpn J Physiol*, 45(6), 921-946.
- Hozo, S. P., Djulbegovic, B., & Hozo, I. (2005). Estimating the mean and variance from the median, range, and the size of a sample. *BMC medical research methodology*, 5(1), 13.
- Huldani, Pattelongi, I., Muhammad Nasrum, M., Idris, I., Bukhari, A., Agung Dwi Wahyu, W., . . . Achmad, H. (2020). Cortisol, IL-6, TNF Alfa, Leukocytes and DAMP on Exercise. [Article]. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6), 474-485. doi: 10.31838/srp.2020.6.74
- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*, 16(5), 448-457.

- Ihsan, M., Périard, J. D., & Racinais, S. (2021). How to integrate recovery during heat acclimation (Vol. 55, pp. 185-186): BMJ Publishing Group Ltd and British Association of Sport and Exercise Medicine.
- Jonsdottir, I. H. (2000). Neuropeptides and their interaction with exercise and immune function. *Immunol Cell Biol*, 78(5), 562-570.
- Kakanis, M. W., Peake, J., Brenu, E. W., Simmonds, M., Gray, B., & Marshall-Gradisnik, S. M. (2014). T helper cell cytokine profiles after endurance exercise. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 34(9), 699-706.
- Kalach, N., Rocchiccioli, F., De Boissieu, D., Benhamou, P. H., & Dupont, C. (2001). Intestinal permeability in children: variation with age and reliability in the diagnosis of cow's milk allergy. *Acta paediatrica*, 90(5), 499-504.
- Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews rheumatology*, 12(1), 49-62.
- Kanikowska, D., Sato, M., Sugeno, J., Iwase, S., Shimizu, Y., Nishimura, N., & Inukai, Y. (2012). No effects of acclimation to heat on immune and hormonal responses to passive heating in healthy volunteers. *Int J Biometeorol*, 56(1), 107-112. doi: 10.1007/s00484-010-0401-6
- Keller, S., Kohne, S., Notbohm, H. L., Bloch, W., & Schumann, M. (2021). Cooling During Endurance Cycling in the Heat: Blunted Core Temperature but Not Inflammatory Responses. *Int J Sports Physiol Perform*, 16(6), 865-870.
- Kilian, Y., Engel, F., Wahl, P., Achtzehn, S., Sperlich, B., & Mester, J. (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*, 116(11), 2177-2186.
- Kitchens, R. L., & Thompson, P. A. (2005). Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *Journal of endotoxin research*, 11(4), 225-229.
- Kitchens, R. L., Thompson, P. A., Viriyakosol, S., O'Keefe, G. E., & Munford, R. S. (2001). Plasma CD14 decreases monocyte responses to LPS by transferring cell-bound LPS to plasma lipoproteins. *The Journal of clinical investigation*, 108(3), 485-493.
- Kitchens, R. L., Wolfbauer, G., Albers, J. J., & Munford, R. S. (1999). Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48), 34116-34122.
- Kraemer, W. J., & Ratamess, N. A. (2005). Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Medicine*, 35(4), 339-361.
- Kruger, K., & Mooren, F. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev*, 13, 37-54.
- Labrie, F., Bélanger, A., Lin, S., Simard, J., Pelletier, G., & Labrie, C. (2005). Is dehydroepiandrosterone a hormone? *Journal of Endocrinology*, 187(2), 169-196.
- Lambert, G. P. (2008). Intestinal barrier dysfunction, endotoxemia, and gastrointestinal symptoms: the 'canary in the coal mine' during exercise-heat stress? *Thermoregulation and Human Performance* (Vol. 53, pp. 61-73): Karger Publishers.
- Landmann, R., Reber, A. M., Sansano, S., & Zimmerli, W. (1996). Function of soluble CD14 in serum from patients with septic shock. *Journal of Infectious Diseases*, 173(3), 661-668.

- Landmann, R., Zimmerli, W., Sansano, S., Link, S., Hahn, A., Glauser, M. P., & Calandra, T. (1995). Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *Journal of Infectious Diseases*, *171*(3), 639-644.
- 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*, *27*, 54-62.
- Leberfingher, M. (2015). World Cup to Shift Seasons in 2022 to Avoid Qatar's Summer Heat Retrieved August 19th, 2019, from <https://www.accuweather.com/en/weather-news/2022-fifa-world-cup-qatar-heat-shift-to-fall/43745676>
- Lee, B. J., & Thake, C. D. (2017). Heat and hypoxic acclimation increase monocyte heat shock protein 72 but do not attenuate inflammation following hypoxic exercise. *Frontiers in Physiology*, *8*, 811.
- Lee, B. J., & Thake, C. D. (2017). Heat and Hypoxic Acclimation Increase Monocyte Heat Shock Protein 72 but Do Not Attenuate Inflammation following Hypoxic Exercise. *Front Physiol*, *8*, 811. doi: 10.3389/fphys.2017.00811
- Legaz-Arrese, A., & Munguía-Izquierdo, D. (2006). Examining the utility of VO₂ peak values to predict performance in elite runners. *Modern Athlete & Coach*, *44*(1), 3-8.
- Leiper, J. B. (2015). Fate of ingested fluids: factors affecting gastric emptying and intestinal absorption of beverages in humans. *Nutrition reviews*, *73*(suppl_2), 57-72.
- Leon, L. R., & Helwig, B. G. (2010). Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. *Journal of Applied Physiology*, *109*(6), 1980-1988.
- Magalhaes, F. D. A., F. T.; Passos, R. L. F.; Fonseca, M. A.; Oliveira, K. P. M.; Lima, M. R. M.; Guimaraes, J. B.; , Ferreira, J. B., Martini, A. R. P., Lima, N. R. V., Soares, D. D., Oliveira, E. M., & Rodrigues, L. O. C. (2010). Heat and exercise acclimation increases intracellular levels of Hsp72 and inhibits exercise-induced increase in intracellular and plasma Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones*, *15*(6), 885-895. doi: 10.1007/s12192-010-0197-7
- Maughan, R., & Shirreffs, S. (2004). Exercise in the heat: challenges and opportunities. *J Sports Sci*, *22*(10), 917-927.
- McCarthy, N. (2014). The World Cup's 10 Hottest Teams Retrieved August 19th, 2019, from <https://www.statista.com/chart/2348/the-world-cups-10-hottest-teams/>
- Mendoza, P. L. (1993). NTP 322: Valoración del riesgo de estrés térmico: índice WBGT. *España: Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo*, *1*, 1-6.
- Migiano, M. J., Vingren, J., Volek, JS., Maresh, CM., Fragala, MS, Ho, J.-Y., Thomas, G. A., Hatfield, D. L., Häkkinen, K., & Ahtiainen, J. (2010). Endocrine response patterns to acute unilateral and bilateral resistance exercise in men. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, *24*(1), 128-134.
- Miloski, B., Aoki, M. S., de Freitas, C. G., de Arruda, A. F. S., de Moraes, D., Borges, Thiago O, & Moreira, A. (2015). Does testosterone modulate mood states and physical performance in young basketball players? *The Journal of Strength & Conditioning Research*, *29*(9), 2474-2481.
- Minuzzi, L. G., Carvalho, H. M., Brunelli, D. T., Rosado, F., Cavaglieri, C. R., Gonçalves, C. E., Gaspar, J. M., & Rama, L. M., Teixeira, A. M. (2017). Acute Hematological and

- Inflammatory Responses to High-intensity Exercise Tests: Impact of Duration and Mode of Exercise. *Int J Sports Med*, 38(07), 551-559.
- Minuzzi, L. G., Teixeira, A. M., & Paiva, A. (2017). *Desporto e envelhecimento ativo: efeitos do treino físico realizado ao longo da vida sobre a imunosenescência em atletas master*. Universidade de Coimbra (Portugal).
- Minuzzi, L. G., Rama, L., Chupel, M. U., Rosado, F., Dos Santos, J. V., Simpson, R., Martinho, A., & Paiva, A., Teixeira, AM. (2018). Effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to acute exercise. *Exercise Immunology Review*, 24.
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *BMJ*, 339, b2535. doi: 10.1136/bmj.b2535
- Moran, D. S., Pandolf, K. B., Shapiro, Y., Heled, Y., Shani, Y., Mathew, W., & Gonzalez, R. (2001). An environmental stress index (ESI) as a substitute for the wet bulb globe temperature (WBGT). *J Therm Biol*, 26(4-5), 427-431.
- Mountjoy, M., Alonso, J.-M., Bergeron, M. F., Dvorak, J., Miller, S., & Migliorini, S. (2012). Hyperthermic-related challenges in aquatics, athletics, football, tennis and triathlon. *Br J Sports Med*, 46(11), 800-804.
- Ng, Q. Y., Lee, K. W., Byrne, C., Ho, T. F., & Lim, C. L. (2008). Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment. *Ann Acad Med Singapore*, 37(4), 307.
- Nielsen, A. R., & Pedersen, B. K. (2007). The biological roles of exercise-induced cytokines: IL-6, IL-8, and IL-15. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(5), 833-839.
- Nieman, D. C. (1994). Exercise, infection, and immunity. *International Journal of Sports Medicine*, 15(S 3), S131-S141.
- Nieman, D. C., Nehlsen-Cannarella, S. L., Henson, D., Koch, A. J., Butterworth, D. E., Fagoaga, O. R., & Utter, A. (1998). Immune response to exercise training and/or energy restriction in obese women. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30(5), 679-686.
- Nybo, L., Rasmussen, P., & Sawka, M. N. (2014). Performance in the heat-physiological factors of importance for hyperthermia-induced fatigue. *Compr Physiol*, 4(2), 657-689.
- Pagana, K., & Pagana, T. (2003). *Mosby's diagnostic and laboratory test reference* (6th edn). Philadelphia: Mosby: Elsevier Science.
- Pandolf, K. (1998). Time course of heat acclimation and its decay. *International Journal of Sports Medicine*, 19(S 2), S157-S160.
- Pandolf, K. B., Sawka, M. N., & Gonzalez, R. R. (1988). *Human performance physiology and environmental medicine at terrestrial extremes*: Benchmark Press.
- Papacosta, E., & Nassis, G. P. (2011). Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science. *J Sci Med Sport*, 14(5), 424-434.
- Papacosta, E., Nassis, G. P., & Gleeson, M. (2016). Salivary hormones and anxiety in winners and losers of an international judo competition. *J Sports Sci*, 34(13), 1281-1287.
- Peake, J., Peiffer, J. J., Abbiss, C. R., Nosaka, K., Okutsu, M., Laursen, P. B., & Suzuki, K. (2008). Body temperature and its effect on leukocyte mobilization, cytokines and

- markers of neutrophil activation during and after exercise. *Eur J Appl Physiol*, 102(4), 391-401. doi: 10.1007/s00421-007-0598-1
- 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*, 21, 8-25.
- Pedersen, B. K., & Hoffman-Goetz, L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews*.
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., & Schjerling, P. (2001). Exercise and interleukin-6. *Current opinion in hematology*, 8(3), 137-141.
- Pedersen., B. K., & Febbraio, M. A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews*, 88(4), 1379-1406.
- Périard, J. D., Cramer, M. N., Chapman, P. G., Caillaud, C., & Thompson, M. W. (2011). Cardiovascular strain impairs prolonged self-paced exercise in the heat. *Experimental Physiology*, 96(2), 134-144.
- Périard, J. D., Travers, G. J., Racinais, S., & Sawka, M. N. (2016). Cardiovascular adaptations supporting human exercise-heat acclimation. *Autonomic Neuroscience*, 196, 52-62.
- Périard., J. D., Racinais, S., & Sawka, M. N. (2015). Adaptations and mechanisms of human heat acclimation: applications for competitive athletes and sports. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 25, 20-38.
- Petersen, A. M. W., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology*, 98(4), 1154-1162.
- Pryor, J. L., Minson, C. T., & Ferrara, M. S. (2018). Heat Acclimation. In D. J. Casa (Ed.), *Sport and Physical Activity in the Heat: Maximizing Performance and Safety* (pp. 33-58). Cham: Springer International Publishing.
- Pugin, J., Schürer-Maly, C., Leturcq, D., Moriarty, A., Ulevitch, R. J., & Tobias, P. S. (1993). Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 2744-2748.
- Pyne, D. B., Guy, J. H., & Edwards, A. M. (2014). Managing heat and immune stress in athletes with evidence-based strategies. *Int J Sports Physiol Perform*, 9(5), 744-750.
- Racinais, S., Mohr, M., Buchheit, M., Voss, S. C., Gaoua, N., Grantham, J., & Nybo, L. (2012). Individual responses to short-term heat acclimatisation as predictors of football performance in a hot, dry environment. *Br J Sports Med*, 46(11), 810-815.
- Racinais, S., Périard, J. D., Karlsen, A., & Nybo, L. (2015). Effect of heat and heat acclimatization on cycling time trial performance and pacing. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47(3), 601.
- Reihmane, D., & Dela, F. (2014). Interleukin-6: possible biological roles during exercise. *European Journal of Sport Science*, 14(3), 242-250.
- Rietjens, R., Stone, T. M., Montes, J., Young, J. C., Tandy, R. D., Utz, J. C., & Navalta, J. W. (2015). Moderate intensity resistance training significantly elevates testosterone following upper body and lower body bouts when total volume is held constant. *International Journal of Kinesiology and Sports Science*, 3(4), 50-55.

- Rodríguez, A. D., González, P. A., García, M. J., de la Rosa, A., Vargasa, M., & Marrero, F. (2003). Ritmo luz/oscuridad de las citocinas proinflamatorias en el infarto agudo de miocardio. *Revista española de cardiología*, 56(6), 555-560.
- Rowell, L. B. (1974). Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiological reviews*, 54(1), 75-159.
- Rowell, L. B. (1986). Thermal Stress. *Human Circulation Regulation During Physical Stress*, 174-212.
- Rowell, L. B., Brengelmann, G. L., Detry, J., & Wyss, C. (1971). Venomotor responses to local and remote thermal stimuli to skin in exercising man. *Journal of Applied Physiology*, 30(1), 72-77.
- Rowell, L. B., Marx, H. J., Bruce, R. A., Conn, R. D., & Kusumi, F. (1966). Reductions in cardiac output, central blood volume, and stroke volume with thermal stress in normal men during exercise. *The Journal of clinical investigation*, 45(11), 1801-1816.
- Santos, V. C., Levada-Pires, A. C., Alves, S. R., Pithon-Curi, T. C., Curi, R., & Cury-Boaventura, M. F. (2013). Changes in lymphocyte and neutrophil function induced by a marathon race. *Cell biochemistry and function*, 31(3), 237-243.
- Saraiva, M., & O'garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*, 10(3), 170-181.
- Sawka, M., Latzka, W., Matott, R., & Montain, S. (1998). Hydration effects on temperature regulation. *International Journal of Sports Medicine*, 19(S 2), S108-S110.
- Sawka, M., & Wenger, C. (1988). Physiological responses to acute exercise-heat stress: ARMY RESEARCH INST OF ENVIRONMENTAL MEDICINE NATICK MA.
- Sawka, M. N. (1996). Thermoregulatory responses to acute exercise-heat stress and heat acclimation. *Handbook of Physiology. Environmental Physiology*, 157-185.
- 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 (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(5), 878-888.
- Schett, G., Dayer, J.-M., & Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(1), 14-24.
- Sedgwick, P., & Marston, L. (2015). How to read a funnel plot in a meta-analysis. *BMJ*, 351, h4718. doi: 10.1136/bmj.h4718
- Shephard, R. J. (1998). Immune changes induced by exercise in an adverse environment. *Can J Physiol Pharmacol*, 76(5), 539-546.
- Simpson, R. J., Kunz, H., Agha, N., & Graff, R. (2015). Exercise and the regulation of immune functions. *Progress in molecular biology and translational science*, 135, 355-380.
- Simpson, R. J., McFarlin, B. K., McSporran, C., Spielmann, G., ó Hartaigh, B., & Guy, K. (2009). Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain, behavior, and immunity*, 23(2), 232-239.
- Singh, L. P., & Kapoor, M. (2013). Development of a four-day rapid acclimation schedule for military personnel. [Abstract]. *Proceedings of the Physiological Society*, 539P-539P.

- Skinner, N. A., MacIsaac, C., Hamilton, J. A., & Visvanathan, K. (2005). Regulation of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 on CD14^{dim}CD16⁺ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clinical & Experimental Immunology*, *141*(2), 270-278.
- Smart, N. A., Waldron, M., Ismail, H., Giallauria, F., Vigorito, C., Cornelissen, V., & Dieberg, G. (2015). Validation of a new tool for the assessment of study quality and reporting in exercise training studies: TESTEX. *Int J Evid Based Healthc*, *13*(1), 9-18. doi: 10.1097/xeb.000000000000020
- Snipe, R., Khoo, A., Kitic, C., Gibson, P., & Costa, R. (2018a). Heat stress during prolonged running results in exacerbated intestinal epithelial injury and gastrointestinal symptoms. *European Journal of Applied Physiology*, *118*(2), 389-400.
- Snipe, R., Khoo, A., Kitic, C., Gibson, P., & Costa, R. (2018b). Mild Heat stress during prolonged running results in exacerbated intestinal epithelial injury and gastrointestinal symptoms. *International Journal of Sports Medicine*, *39*(4), 255-263.
- Steensberg, A., Toft, A. D., Bruunsgaard, H., Sandmand, M., Halkjær-Kristensen, J., & Pedersen, B. K. (2001). Strenuous exercise decreases the percentage of type 1 T cells in the circulation. *Journal of Applied Physiology*, *91*(4), 1708-1712.
- Stelter, F., Witt, S., Füll, B., Jack, R., Hartung, T., & Schütt, C. (1998). Different efficacy of soluble CD14 treatment in high-and low-dose LPS models. *European journal of clinical investigation*, *28*(3), 205-213.
- Sterne, J. A. C., Egger, M., & Smith, G. D. (2001). Investigating and dealing with publication and other biases in meta-analysis. *BMJ*, *323*(7304), 101-105. doi: 10.1136/bmj.323.7304.101
- Suzuki, K. (2018). Cytokine response to exercise and its modulation. *Antioxidants*, *7*(1), 17.
- Tamura, Y., Higuchi, Y., Kataoka, M., Akizuki, S. i., Matsuura, K., & Yamamoto, S. (1999). CD14 transgenic mice expressing membrane and soluble forms: comparisons of levels of cytokines and lethality in response to lipopolysaccharide between transgenic and non-transgenic mice. *International immunology*, *11*(3), 333-339.
- 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*, *38*(2), 293-304.
- Tossige-Gomes, R., Ottone, V., Oliveira, P., Viana, D., Araujo, T., Gripp, F., & Rocha-Vieira, E. (2014). Leukocytosis, muscle damage and increased lymphocyte proliferative response after an adventure sprint race. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *47*, 492-498.
- Travers, G., Nichols, D., Riding, N., González-Alonso, J., & Périard, J. D. (2020). Heat acclimation with controlled heart rate: influence of hydration status. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *52*(8), 1815-1824.
- Tsai, M. L., Ko, M. H., Chang, C. K., Chou, K. M., & Fang, S. H. (2011). Impact of intense training and rapid weight changes on salivary parameters in elite female Taekwondo athletes. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *21*(6), 758-764.
- van de Veerdonk, F., & Netea, M. (2013). New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members. [Review]. *Frontiers in Immunology*, *4*(167). doi: 10.3389/fimmu.2013.00167

- Vargas, N. T., & Marino, F. (2014). A neuroinflammatory model for acute fatigue during exercise. *Sports Medicine*, *44*(11), 1479-1487. doi: 10.1007/s40279-014-0232-4
- Vingren, J. L., Kraemer, W. J., Ratamess, N. A., Anderson, J. M., Volek, J. S., & Maresh, C. M. (2010). Testosterone physiology in resistance exercise and training. *Sports Medicine*, *40*(12), 1037-1053.
- Vining, R. F., & McGinley, R. A. (1987). The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *Journal of steroid biochemistry*, *27*(1-3), 81-94.
- Vining, R. F., McGinley, R. A., & Symons, R. G. (1983). Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clinical chemistry*, *29*(10), 1752-1756.
- Walsh, N. P., & Oliver, S. J. (2016). Exercise, immune function and respiratory infection: An update on the influence of training and environmental stress. *Immunol Cell Biol*, *94*(2), 132-139. doi: 10.1038/icb.2015.99
- Walsh, N. P., & Whitham, M. (2006). Exercising in environmental extremes. *Sports Medicine*, *36*(11), 941-976. doi: 10.2165/00007256-200636110-00003
- Walsh., N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Gleeson, M., Woods, J. A., Bishop, N., . . . Hoffman-Goete, L. (2011). Position statement part one: immune function and exercise.
- Wang, Z., Hu, J., Fan, R., Zhou, J., & Zhong, J. (2012). Association between CD14 gene C-260T polymorphism and inflammatory bowel disease: a meta-analysis.
- Wenger, C. B., & Roberts, M. F. (1980). Control of forearm venous volume during exercise and body heating. *Journal of Applied Physiology*, *48*(1), 114-119.
- Willmott, A. G. B., Hayes, M., James, C. A., Dekerle, J., Gibson, O. R., & Maxwell, N. S. (2018). Once- and twice-daily heat acclimation confer similar heat adaptations, inflammatory responses and exercise tolerance improvements. *Physiological Reports*, *6*(24). doi: 10.14814/phy2.13936
- Wolkow, A., Ferguson, S. A., Vincent, G. E., Larsen, B., Aisbett, B., & Main, L. C. (2015). The impact of sleep restriction and simulated physical firefighting work on acute inflammatory stress responses. *Plos One*, *10*(9), e0138128.
- Wong, W., Crane, E. D., Kuo, Y., Kim, A., & Crane, J. D. (2019). The exercise cytokine interleukin-15 rescues slow wound healing in aged mice. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(52), 20024-20038.
- Wonner, R., Wallner, S., Orsó, E., & Schmitz, G. (2018). Effects of acute exercise on monocyte subpopulations in metabolic syndrome patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94*(4), 596-605.
- Zuhl, M., Schneider, S., Lanphere, K., Conn, C., Dokladny, K., & Moseley, P. (2014). Exercise regulation of intestinal tight junction proteins. *Br J Sports Med*, *48*(12), 980-986.

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre

Está a ser convidado a participar na investigação “*Efeito da Aclimação ao Calor na Resposta Fisiológica, Imune e Endotóxica, em Condições Ambientais Clássicas e Climatério de Laboratório e de Estresse Térmico em Corredores*”, tendo como responsável pelo projeto o estudante M.Sc. Marcio Cascante Rusenhack, e como orientadora a Professora Dra. Ana Maria Miranda Botelho Teixeira, e coorientadores, o Professor Dr. Amândio Manuel Cúcido Santos da Universidade de Coimbra e o Professor Dr. José Moncada Jiménez da Tese no âmbito do Doutoramento em Ciências do Desporto - Ramo de Atividade Física e Saúde, orientada pela professora Dra. Ana Maria Miranda Botelho Teixeira e pelos professores Dr. Amândio Manuel Cúcido Santos da Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra e Dr. José Moncada Jiménez da escola de Educação Física e Desporto e do Centro de Investigação em Ciências do Movimento Humano da Universidade de Costa Rica.

O objetivo principal de este estudo foi determinar o efeito do exercício em condições ambientais clássicas de climatério de laboratório assim como em condições ambientais de estresse térmico nas respostas fisiológicas, inflamatórias e endotóxicas, em atletas, antes e depois de realizar um protocolo de aclimação ao calor.

Não existem riscos previsíveis para a realização dos testes e da aclimação ao calor.

O presente estudo conta com benefícios esperados da aclimação ao calor no desempenho físico, na adaptação das variáveis fisiológicas, imunes e endotóxicas.

Os atletas vão ter acompanhamento e assistência de forma permanente desde o momento em que cheguem aos laboratório.

As amostras de sangue serão retiradas por profissionais em enfermagem. Os tubos para as recolhas de saliva, vão ser feitas em tubos imunizados. As amostras de urina vão ser feitas em lugares com privacidade para cada um dos participantes.

Os participantes tem plenos direitos para recusar a sua participação em qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer penalidade ou prejuízo para o mesmo ou para a pesquisa, não desenvolvendo represálias de qualquer natureza.

Pede-se ao participante que não ingira quaisquer tipos de bebidas alcoólicas nas 48 horas que antecedem os testes, assim como cafeína nas 8 horas prévias. A realização de exercícios de intensidade alta também não se recomendam nas 48 horas que antecedem os testes. Idealmente, o atleta deverá realizar a sua rotina de treino e nutrição normalmente, sem esquecer cumprir com as suas horas de descanso. Se recomenda se manter em condições de euhidratação durante todos de duração desta pesquisa. Pede-se ao atleta a ingestão de 200ml de água nas duas horas prévias aos testes.

Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra – FCDEF-UC
Gabinete de Planeamento, Projetos e Atividades; Estádio Universitário de Coimbra, 3040-256 –
Coimbra, Portugal – Contacto: (+351) 239 802 770 / Fax: (+351) 2339 802 779 / email:
finaceiros@fcdef.uc.pt / homepage: <https://www.uc.pt/fcdef/sevicos/GPPA>
Marcio Cascante Rusenhack / Contacto: (+351) 914 870 614 / email: marciocascante@gmail.com

ANEXO II

O tratamento de dados será realizado de forma confidencial, e assim evitar prejuízos ao participante. A partilha de dados apenas poderá ocorrer de forma anónima.

Não haverá nenhuma forma de reembolso de dinheiro, já que a participação no estudo é voluntária e gratuita, não terá nenhum gasto.

Se pedirá ao participante assinar uma via de Termo de Consentimento Livre e será entregue uma cópia do mesmo ao atleta.

Em caso de contacto, reclamação ou denúncia, encontram-se no final da página, referenciados os contactos para devido efeito.

X _____ M.Sc. Marcio Cascante Rusenhack Estudante responsável pelo projeto	X _____ Prof.ª Dra. Ana Maria Teixeira Orientadora do projeto
X _____ Prof. Amâdio Cúpidio Santos Co-orientador responsável pelo projeto	X _____ (Nome do atleta participante) Atleta participante na investigação

Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra – FCDEF-UC
Gabinete de Planeamento, Projetos e Atividades; Estádio Universitário de Coimbra, 3040-256 –
Coimbra, Portugal – Contacto: (+351) 239 802 770 / Fax: (+351) 2339 802 779 / email:
finaceiros@fcdef.uc.pt / homepage: <https://www.uc.pt/fcdef/sevicos/GPPA>
Marcio Cascante Rusenhack / Contacto: (+351) 914 870 614 / email: marciocascante@gmail.com