

O treino de natação modifica a resposta aguda das células imunitárias a uma sessão de alta intensidade

Autores

José Pedro Morgado^{1,2}; Catarina Matias^{1,3,4}; Joana Filipa Reis^{1,5}; Júlia Teles⁶; Maria José Laires¹; Francisco Alves^{1,5}; Cristina Paula Monteiro^{1,5}

morgado.ze@gmail.com

Resumo

OBJECTIVO: estudar a influência de um macrociclo de treino de natação (4 meses) sobre a resposta da imunidade celular a uma sessão de treino de alta intensidade considerando sexo, maturidade e escalão competitivo.

MÉTODOS: 43 nadadores (16 femininos; 27 masculinos) realizaram uma sessão de alta intensidade, após a competição principal do 1º (M1) e do 2º (M2) macrociclos da época. Recolheram-se amostras de sangue antes (Pré), imediatamente após (Pós), 2h após (Pós2h) e 24 h após (Pós24h) a sessão. Foi efetuado um hemograma e um leucograma com um contador automático de células e uma quantificação das subpopulações de linfócitos por citometria de fluxo. Os sujeitos foram agrupados de acordo com sexo, escalão competitivo ou estadio maturacional de Tanner. Monitorizaram-se os sintomas respiratórios superiores (URS) e carga de treino ao longo do macrociclo.

RESULTADOS: em M2, observaram-se menores aumentos dos leucócitos totais e neutrófilos no Pós; e uma recuperação menos eficiente dos linfócitos totais e CD19+ no Pós2h. No Pós2h, o aumento da razão CD4+/CD8+ foi menor nos juvenis e maior nos seniores; e no Pós24h os CD16+56+ dos nadadores púberes recuperaram menos eficientemente.

CONCLUSÕES: Os efeitos cumulativos da carga de treino atenuaram a resposta do sistema imunitário à sessão de treino e diminuíram a eficiência da recuperação, especialmente nos atletas mais jovens. O concomitante aumento das URS durante o macrociclo sugere um

¹ Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, CIPER, Faculdade Motricidade Humana, Universidade de Lisboa

² Universidade Europeia

³ Bioperformance & Nutrition Research Unit, Ingrediente Métrico S.A.

⁴ CIDEFES - Centro de Investigação em Desporto, Educação Física, Exercício e Saúde, Universidade Lusófona

⁵ CIPER - Centro Interdisciplinar de Estudos da Performance Humana, Faculdade Motricidade Humana

⁶ Laboratório de Métodos Matemáticos, CIPER, Faculdade Motricidade Humana, Universidade de Lisboa

período de suscetibilidade à infeção mais longo após as sessões de treino, o que torna o tempo de descanso efetivo um importante fator a considerar no planeamento.

Palavras-chave: Imunologia do Exercício, Nadadores, Sessão de treino, Macro ciclo, Leucócitos, Subpopulações de Linfócitos

INTRODUÇÃO

Nas competições importantes, uma condição imunitária, metabólica, hormonal, circulatória e respiratória saudável, juntamente com uma capacidade funcional otimizada permitirá ao atleta atingir o melhor desempenho ¹. Esta condição ideal resulta de um equilíbrio adequado entre carga de treino e a recuperação ao longo das diferentes fases da periodização de uma época desportiva ². No entanto, em desportos de *endurance*, como a natação, durante os ciclos de elevado volume e intensidade de treino que incluem sessões consecutivas com pouco tempo de recuperação entre elas, os atletas podem experimentar ao mesmo tempo uma diminuição temporária do desempenho e um estado de imunodepressão ^{3, 4}.

Na literatura em Imunologia do Exercício observa-se de forma consistente um aumento do número de algumas populações de leucócitos circulantes após uma única sessão intensa de natação ⁵⁻⁷, o que sugere um aumento geral da vigilância da imunidade celular inata e adquirida, conferindo assim uma melhor defesa temporária ao hospedeiro ⁸. Durante o período inicial de recuperação após o exercício, observou-se a manutenção da leucocitose e neutrofilia ^{5, 9}, enquanto os monócitos recuperaram rapidamente para valores pré-exercício e os linfócitos diminuíram ⁵.

No que diz respeito ao efeito de épocas de treino de natação com durações de 3 a 7 meses, foram observados decréscimos nos números em repouso para os CD56⁺ NK ^{3, 10, 11}, neutrófilos e monócitos ¹², tendo sido proposto que o treino intenso durante longos períodos afete o número e a função das células imunitárias inatas e adquiridas em repouso, possivelmente contribuindo para aumentar o risco de infeção ⁸ e reduzir a assiduidade aos treinos.

No entanto, as modificações agudas e crónicas da imunidade sistémica em resposta ao esforço de natação têm vindo a ser analisadas separadamente. É desejável uma abordagem mais integrada, uma vez que as alterações da imunidade celular podem

influenciar o potencial do nadador para responder adequadamente nas sessões de treino de alta intensidade ao longo da época competitiva. Este potencial é indispensável para a aquisição de adaptações positivas.

O presente estudo pretendeu investigar a influência de um macrociclo de 4 meses de treino de natação na resposta imunitária celular a uma sessão de treino de natação de alta intensidade, integrada no processo de treino normal, durante o período de recuperação de 24 h, controlando os efeitos do sexo, maturidade e escalão competitivo.

METODOLOGIA

Participantes

Um total de 43 nadadores (37% fem. $14,4 \pm 1,1$ anos; masc. $16,2 \pm 2,0$ anos), com 15-18 h de treino na água e 4-7 h de treino fora de água ou ginásio por semana, com diferentes percursos competitivos (experiência média de $5,5 \pm 0,3$ anos) foi distribuído por grupos de idade de acordo com o regulamento da Federação Portuguesa de Natação e da *Ligue Européene de Natation* ou por grupos de maturidade.

Após esclarecimento detalhado dos objetivos e procedimentos, foi solicitado aos participantes, ou seus encarregados de educação quando apropriado, um consentimento informado por escrito. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética da Faculdade de Motricidade Humana da Universidade de Lisboa e foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsínquia para Estudos com Humanos¹³.

Desenho de Estudo

Neste estudo foi avaliado o impacto do 2º macrociclo de uma época de inverno de natação com duração de 4 meses. Os nadadores seguiram o programa de treino definido pelos treinadores.

A avaliação dos nadadores foi feita em dois momentos: M1 (após a competição principal do 1º macrociclo) e M2 (após a competição principal do 2º macrociclo).

Em cada momento de avaliação, os nadadores realizaram uma sessão de natação padronizada de alta intensidade que estava incluída na periodização; O perfil imunitário foi avaliado antes (Pré), imediatamente após (Pós), 2h após (Pós2h) e 24h

após (Pós24h) as sessões de treino. Avaliou-se a idade cronológica e um indicador de maturidade biológica. Os atletas foram instruídos a cumprir 8 h de sono e 24 h sem realizar exercício intenso antes das avaliações, e jejum após as 22 h da noite anterior. As sessões experimentais decorreram entre as 6h30 e as 10h00.

Ao longo da época monitorizou-se semanalmente a incidência de Sintomas Respiratórios Superiores (URS) e quantificou-se a carga de treino e a intensidade média de todas as sessões de natação realizadas.

Maturidade

Os participantes preencheram o questionário de autoavaliação do grau de desenvolvimento mamário, genital e pilosidade púbica ¹⁴ sendo agrupados de acordo com os 5 estadios maturacionais de Tanner ¹⁴.

Época de treino

O macrociclo de 4 meses de treino observado constituiu o 2º de uma época competitiva de natação (Fig. 1). Este macrociclo iniciou com um período preparatório caracterizado por um aumento do volume, intensidade e frequência de treino que durou até o final da subfase de preparação específica, atingindo o pico de carga de treino da época na semana 23. A partir daí, a carga de treino foi reduzindo progressivamente no sentido da preparação para o Campeonato Nacional.

Quantificação da carga de treino

A carga de treino de cada sessão foi caracterizada pela quantificação do volume (quantidade total de metros nadados) e unidades arbitrárias de carga (UAC) ^{2, 15 12} nos macrociclos antes de cada avaliação.

Sessão de treino de natação

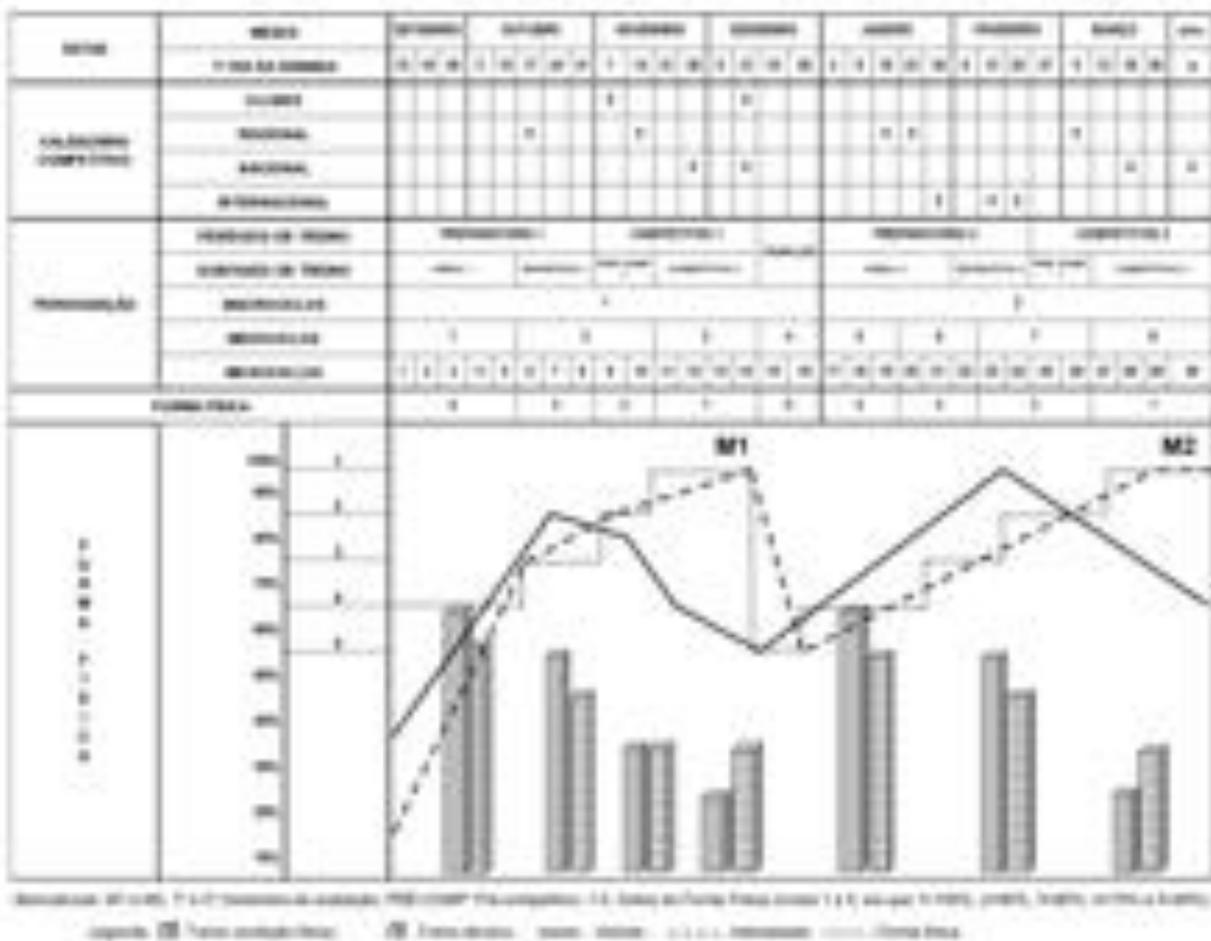
A sessão padronizada teve um aquecimento de 1500 m (30 a 35 min) seguido da tarefa principal de alta intensidade (50 min) e de uma recuperação de 500 m (8 min). A tarefa principal procurou induzir a acumulação máxima de lactato (AML) e consistiu em duas séries de 4 repetições de 75 m (juvenis) ou de 100 m (juniores e seniores) de crol com saídas a cada 5 min e 10 min de recuperação ativa entre as séries. A redução da distância para os juvenis pretendeu atingir um esforço situado na mesma

zona de intensidade de AML, nivelando o impacto fisiológico entre os escalões. Foi solicitado aos nadadores para realizarem cada repetição a 90 - 95% do melhor tempo pessoal da prova dos 100 m livres.

Foram registados os tempos das séries e calculadas as percentagens em relação ao melhor registo na prova de 100 m livres.

A frequência cardíaca (FC) foi monitorizada com um cardiofrequencímetro (Polar RS800CXTM, Kempele, Finlândia).

Fig. 1. Percentagem de carga competitiva da sessão em relação ao tempo ao longo do treino e representado de 0 a 100% a cada repetição das duas sessões de competição.



Perfil Imunitário

Amostras de sangue venoso periférico foram colhidas segundo procedimentos padrão para avaliação de hemoglobina e hematócrito e contagem de leucócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos por autoanálise (Coulter LH 750, Beckman), e de linfócitos totais e subpopulações (CD3⁺, T totais; CD4⁺, T auxiliares; CD8⁺, T citotóxicos, CD16⁺56⁺ Natural Killer (NK); e CD19⁺, B) por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences). Os valores Pós, Pós2h e Pós24h foram corrigidos para a variação do volume plasmático ¹⁶.

Sintomas Respiratórios Superiores

Os atletas autorreportaram os sintomas respiratórios superiores (URS) usando tabelas de registo diárias nas 4 semanas antes de M1 e M2 e indicaram, quando aplicável, a medicação que tomaram.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada nos softwares IBM SPSS Statistics (versão 21) e R (versão 2.15.1), com nível de significância de 5 %. Foram calculadas as diferenças relativas de Pré para Pós, para Pós2h e para Pós24h (%).

Utilizou-se o teste t para uma amostra para comparar as médias dos grupos com os limites superior e inferior dos intervalos de referência das variáveis clínicas ^{17, 18}.

A influência do sexo, maturidade e escalão de natação no efeito do treino sobre a resposta imunitária à sessão de natação foi avaliada através de ANOVAs não paramétricas *mixed-design* (*nparLD* ¹⁹, software R) considerando ANOVA (ATS) para cada efeito e ANOVA modificada (MATS) para o fator do sujeito.

O momento da avaliação, denominado efeito do treino, foi considerado o factor intra-sujeitos (dois níveis: M1 e M2), e os fatores inter-sujeitos foram as variáveis de influência mencionadas ^{7, 20}.

Para analisar a influência do treino sobre a resposta imunitária aguda ao exercício, independentemente de qualquer um dos fatores inter-sujeitos testados, utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon.

RESULTADOS

Nenhum sujeito se classificou nos estádios 1, 2 ou 3 de Tanner.

Tal como solicitado, as tarefas principais das sessões de treino foram realizadas à intensidade relativa de $92,3 \pm 4,7\%$ em M1 e $93,4 \pm 7,2\%$ em M2.

Em M1 e M2, o perfil imunitário em repouso dos participantes estava no intervalo de referência associado a cada variável ¹⁸.

Carga de treino da época

A caracterização da carga de treino do macrociclo e das 4 semanas anteriores a M1 e a M2 está apresentada na Tabela 1. O nível da carga das 4 semanas que antecederam M2 foi menor do que o das 4 semanas que antecederam M1. O volume e nível da carga do macrociclo anterior a M2 também foram inferiores aos do macrociclo que antecedeu M1.

Tabela 1 Média \pm desvio-padrão dos valores semanais de volume de treino e nível da carga de todo o macrociclo e das 4 semanas anteriores ao primeiro (M1) e segundo (M2) momentos de avaliação

Parâmetros de carga de treino	M1	M2
Volume (m):		
4 semanas	30696 \pm 3991	29157 \pm 7397
totalidade do macrociclo	30050 \pm 5120	37302 \pm 10331 *
Nível de carga de treino (UAC):		
4 semanas	12,0 \pm 0,8	11,4 \pm 0,8 *
totalidade do macrociclo	11,9 \pm 0,6	12,3 \pm 0,8 *

Abreviaturas: UAC, unidades arbitrárias da carga de treino; *, diferente de M1 ($p < 0,05$)

Efeito do treino sobre as alterações agudas das células imunitárias em resposta ao exercício

Considerando os efeitos do macrociclo de 4 meses de treino sobre a resposta à sessão de treino, em M2, o aumento de leucócitos e neutrófilos do Pré para o Pós foi menor (Fig. 2a e 2b) e a diminuição de linfócitos totais (Fig. 2c) e a magnitude da variação dos CD19⁺ (Fig. 2d) do Pré para o Pós2h foram maiores. Os efeitos sobre os CD16⁺56⁺ de Pré para Pós24h foram dependentes da maturidade [$F(1, \infty) = 4,470$, $p = 0,035$] com uma variação negativa superior nos nadadores púberes em M2 (Fig. 2e). As alterações da razão CD4⁺/CD8⁺ de Pré para Pós2h foram dependentes do escalão [$F(1,881, \infty) = 10,847$, $p = 0,000$] com um aumento mais acentuado da razão CD4⁺/CD8⁺ nos séniores e aumento menos acentuado nos juniores em M2 (Fig. 2f).

Sintomas Respiratórios Superiores

Durante as 4 semanas anteriores ao M2 houve uma maior frequência de episódios de URS do que ao longo das 4 semanas anteriores a M1 (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Em ambas as sessões de treino, o número de leucócitos totais e de neutrófilos sofreu um aumento seguido de uma diminuição, enquanto os linfócitos totais e algumas subpopulações diminuíram numa fase inicial e posteriormente voltaram a subir, mesmo que não atingindo os valores pré-sessão. No final do macrociclo, o menor aumento dos leucócitos e neutrófilos de Pré para Pós sugere uma resposta aguda atenuada, talvez resultante de um recrutamento menor de células dos reservatórios ou do *pool* de células marginadas²¹. Além disso, a maior magnitude da diminuição de linfócitos totais e CD19⁺ de Pré para Pós2h sugere uma recuperação menos eficiente da imunidade adquirida (em particular linfócitos CD19⁺) nas primeiras 2 h após a sessão de treino intenso, e um intervalo maior de suscetibilidade às infeções do que no início do macrociclo.

Fig. 2 Média \pm desvio padrão da diferença relativa (%) dos valores celulares de leucócitos (a), neutrófilos (b), linfócitos totais (c), e subpopulações CD19⁺ (d), CD16⁺56⁺ (e), e razão CD4⁺/CD8⁺ (f) em resposta a uma sessão de treino de natação de alta intensidade padronizada realizada no início (M1) e no final (M2) de um macrociclo de 4 meses de treino de natação.

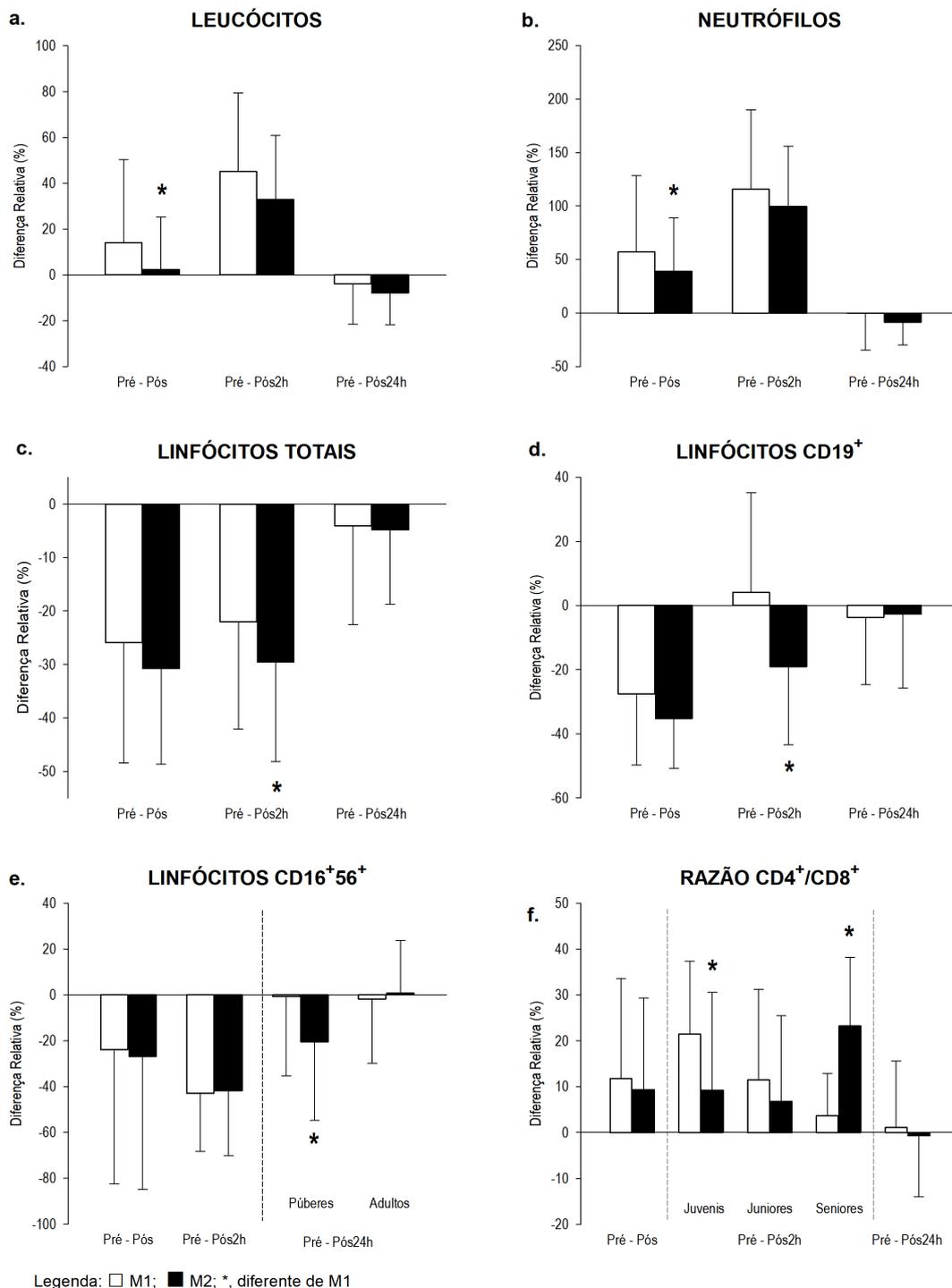
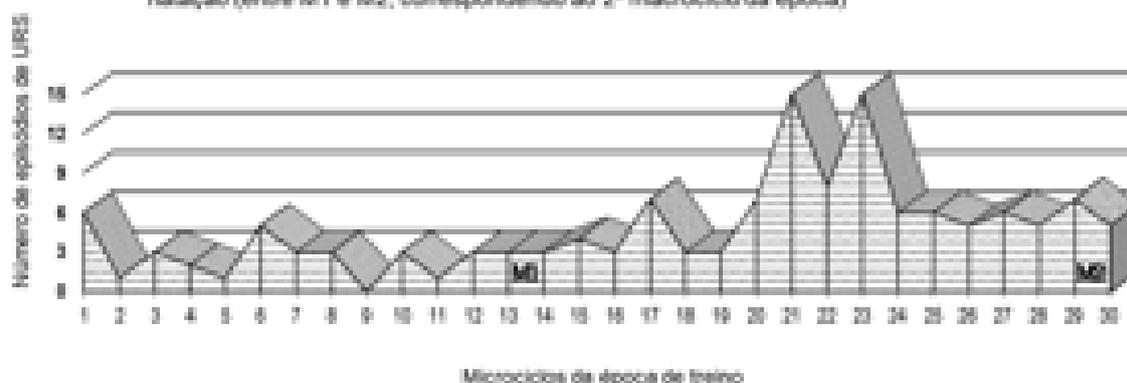


Fig. 3 Número de episódios semanais de Sintomas Respiratórios Superiores (URS) ao longo da época de treino em que se incluiu o macrociclo de 4 meses de treino de natação (entre M1 e M2; correspondendo ao 2º macrociclo da época)



Embora o nível de intensidade da carga de treino das 4 semanas prévias a M2 tenha sido ligeiramente menor do que nas 4 semanas prévias a M1, a carga de treino de todo o macrociclo anterior a M2 foi maior do que no anterior a M1. Simultaneamente, o número de URS tendeu a ser maior antes de M2 do que antes de M1. Estas evidências sugerem uma possível depressão imunitária que poderá ter resultado dos efeitos cumulativos das cargas de treino de natação reforçando os resultados da literatura ²².

Ao longo da adolescência, os níveis fisiológicos de certas hormonas variam. O seu efeito diferencial e o das citocinas nas subpopulações de linfócitos ^{23, 24} podem influenciar as respostas imunitárias ao exercício e, portanto, devem ser considerados. Timmons e colaboradores ²⁵ observaram que, quando expostos a condições iguais de exercício, as respostas imunitárias celulares e humorais foram menores em meninos pré-púberes e no início da puberdade do que em homens adultos²⁵ e que a recuperação de exercícios vigorosos foi mais rápida em crianças do que em adultos ²⁶. Embora estes autores não tenham investigado a influência do treino na resposta aguda ao exercício, os seus resultados destacam a importância de controlar as variáveis relacionadas com idade, especialmente durante a adolescência. Adicionalmente, a maior dificuldade de recuperação dos CD16⁺56⁺ em 24 h nos nadadores púberes, e a menor magnitude da variação da razão CD4⁺/CD8⁺ durante a recuperação inicial nos juvenis em M2, sugere que nos atletas mais jovens as respostas imunitárias foram mais sensíveis à influência do treino.

A redução das respostas celulares pode resultar da redução da capacidade de recrutamento e de proliferação celulares e/ou aumento da morte celular ²¹ que poderão ser explicadas pelas adaptações crónicas na aderência das células ao endotélio e sua redistribuição entre órgãos ou compartimentos, e das respostas fisiológicas agudas ao exercícios, nomeadamente, débito cardíaco, forças de cisalhamento e fluxo sanguíneo para os músculos ativos, e da melhoria na capacidade para manter estáveis o pH e a temperatura ²⁷. O treino pode ter influenciado as concentrações de catecolaminas e cortisol e a sua ação na regulação da redistribuição das subpopulações de linfócitos ^{28, 29}. Durante o período de recuperação após o exercício, o cortisol controla a entrada de linfócitos em circulação, contribuindo para o seu retorno aos compartimentos linfóides ³⁰ e regula a linfopenia e a neutrofilia ^{28, 29}. Apesar dos efeitos gerais do cortisol, decorrentes do treino, sobre os linfócitos em repouso não serem claros na literatura e não terem sido avaliados, conseguimos especular que o cortisol poderá explicar, em parte, a recuperação menos eficiente dos linfócitos totais e dos CD19⁺ após a sessão de natação no final do macrociclo.

É comumente aceite que os incrementos da carga de treino durante os períodos de elevado volume e intensidade de treino a que atletas estão sujeitos poderão conduzir à estimulação de mecanismos adaptativos das respostas metabólicas, circulatórias hormonais e respiratórias que poderão comprometer o desempenho e, conseqüentemente induzir um compromisso do estado imunitário, que inclui diminuição no número e atividade dos linfócitos T e B ^{8, 31}. Esta conjuntura pode contribuir para elevar o risco de infeção, porém, a literatura sugere que esta situação se pode reverter com um período de *taper* ou recuperação ^{8, 32}.

Assim, treinadores e atletas devem implementar estratégias de intervenção e comportamento durante os períodos de *taper*, a fim de contribuir para a manutenção das condições de saúde, evitando o aparecimento de fadiga e diminuição do desempenho associado, ajudando assim a evitar doenças e ausências nos treinos e a atingir o pico de desempenho nas competições. Além disso, os atletas devem tomar precauções especiais durante as primeiras horas após sessões de treino intenso.

CONCLUSÕES

Os efeitos cumulativos das cargas de treino parecem ter induzido uma redução geral da capacidade do sistema imunitário em responder a sessões de treino intensas, especialmente em atletas mais jovens, o que torna o tempo de descanso efetivo um importante fator a considerar no planeamento.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos atletas e treinadores envolvidos o tempo e esforço. JPM, CNM e JFR foram apoiados por bolsa da Fundação para a Ciência e Tecnologia e o estudo foi financiado pelo Centro Interdisciplinar de Estudos da Performance Humana (CIPER).

BIBLIOGRAFIA

1. Hellard, P.; Avalos, M.; Hausswirth, C.; Pyne, D.; Toussaint, J. F.; Mujika, I., Identifying Optimal Overload and Taper in Elite Swimmers over Time. *J Sports Sci Med* 2013, 12 (4), 668-78.
2. Mujika, I.; Chatard, J. C.; Busso, T.; Geysant, A.; Barale, F.; Lacoste, L., Effects of training on performance in competitive swimming. *Can J Appl Physiol* 1995, 20 (4), 395-406.
3. Rama, L.; Teixeira, A. M.; Matos, A.; Borges, G.; Henriques, A.; Gleeson, M.; Pedreiro, S.; Filaire, E.; Alves, F.; Paiva, A., Changes in natural killer cell subpopulations over a winter training season in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol* 2013, 113 (4), 859-68.
4. Gleeson, M., Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* (1985) 2007, 103 (2), 693-9.
5. Kargotich, S.; Keast, D.; Goodman, C.; Crawford, G. P.; Morton, A. R., The influence of blood volume changes on leucocyte and lymphocyte subpopulations in elite swimmers following interval training of varying intensities. *Int J Sports Med* 1997, 18 (5), 373-80.

6. Morgado, J. P.; Monteiro, C. P.; Matias, C. N.; Alves, F.; Pessoa, P.; Reis, J.; Martins, F.; Seixas, T.; Laires, M. J., Sex-based effects on immune changes induced by a maximal incremental exercise test in well-trained swimmers. *J Sports Sci Med* 2014, 13 (3), 708-14.
7. Morgado, J. P.; Monteiro, C. P.; Teles, J.; Reis, J. F.; Matias, C.; Seixas, M. T.; Alvim, M. G.; Bourbon, M.; Laires, M. J.; Alves, F., Immune cell changes in response to a swimming training session during a 24-h recovery period. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016, 1-8.
8. Walsh, N. P.; Gleeson, M.; Shephard, R. J.; Gleeson, M.; 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., Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011, 17, 6-63.
9. Ferrer, M. D.; Tauler, P.; Sureda, A.; Tur, J. A.; Pons, A., Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *J Sports Sci* 2009, 27 (1), 49-58.
10. Gleeson, M.; McDonald, W. A.; Cripps, A. W.; Pyne, D. B.; Clancy, R. L.; Fricker, P. A., The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol* 1995, 102 (1), 210-6.
11. Gleeson, M.; McDonald, W. A.; Pyne, D. B.; Clancy, R. L.; Cripps, A. W.; Francis, J. L.; Fricker, P. A., Immune status and respiratory illness for elite swimmers during a 12-week training cycle. *Int J Sports Med* 2000, 21 (4), 302-7.
12. Morgado, J. M.; Rama, L.; Silva, I.; de Jesus Inacio, M.; Henriques, A.; Laranjeira, P.; Pedreiro, S.; Rosado, F.; Alves, F.; Gleeson, M.; Pais, M. L.; Paiva, A.; Teixeira, A. M., Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol* 2012, 112 (2), 471-82.
13. World Medical Association, Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research involving Human Subjects. *WMJ* 2008, 54 (4), 122-125.
14. Tanner, J. M., *Growth at Adolescence*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1962.
15. Mujika, I.; Busso, T.; Lacoste, L.; Barale, F.; Geysant, A.; Chatard, J. C., Modeled responses to training and taper in competitive swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 1996, 28 (2), 251-8.

16. Dill, D. B.; Costill, D. L., Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 1974, 37 (2), 247-8.
17. INSA, I. N. d. S. D. R. J., IP, Boletim de Análises Clínicas – Valores Referência Subpopulações Linfocitárias. INSA: Portugal, 2011.
18. Lewis, S. M.; Bain, B. J.; Bates, I., *Dacie and Lewis Practical Haematology*. 10 ed.; Churchill Livingstone Elsevier: 2006.
19. Noguchi, K.; Gel, Y. R.; Brunner, E.; Konietzschke, F., nparLD: An R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *J Stat Softw* 2012, 50 (12), 1-23.
20. Morgado, J. P.; Matias, C. N.; Monteiro, C. P.; Alves, F.; Reis, J. F.; Santos, D. A.; Silva, A. M.; Martins, F.; Seixas, M. T.; Rocha-Pereira, P.; Sardinha, L. B.; Laires, M. J., Comparison of immunohematological profile between endurance- and power-oriented elite athletes. *Appl Physiol Nutr Metab* 2017, 42 (3), 257-262.
21. Kruger, K.; Mooren, F. C., Exercise-induced leukocyte apoptosis. *Exerc Immunol Rev* 2014, 20, 117-34.
22. Morgado, J. P.; Matias, C. N.; Reis, J. F.; Curto, D.; Alves, F. B.; Monteiro, C. P., The Cellular Composition of the Innate and Adaptive Immune System Is Changed in Blood in Response to Long-Term Swimming Training. *Front Physiol* 2020, 11, 471.
23. Nemet, D.; Eliakim, A., Growth hormone-insulin-like growth factor-1 and inflammatory response to a single exercise bout in children and adolescents. *Med Sport Sci* 2010, 55, 141-55.
24. Steensberg, A.; Toft, A. D.; Schjerling, P.; Halkjaer-Kristensen, J.; Pedersen, B. K., Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinephrine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, 281 (3), C1001-4.
25. Timmons, B. W.; Tarnopolsky, M. A.; Snider, D. P.; Bar-Or, O., Immunological changes in response to exercise: influence of age, puberty, and gender. *Med Sci Sports Exerc* 2006, 38 (2), 293-304.
26. Timmons, B. W.; Tarnopolsky, M. A.; Bar-Or, O., Immune responses to strenuous exercise and carbohydrate intake in boys and men. *Pediatr Res* 2004, 56 (2), 227-34.

27. Adams, G. R.; Zaldivar, F. P.; Nance, D. M.; Kodesh, E.; Radom-Aizik, S.; Cooper, D. M., Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain Behav Immun* 2011, 25 (4), 658-66.
28. McCarthy, D. A.; Grant, M.; Marbut, M.; Watling, M.; Wade, A. J.; Macdonald, I.; Nicholson, S.; Melsom, R. D.; Perry, J. D., Brief exercise induces an immediate and a delayed leucocytosis. *Br J Sports Med* 1991, 25 (4), 191-5.
29. Mignini, F.; Traini, E.; Tomassoni, D.; Vitali, M.; Streccioni, V., Leucocyte subset redistribution in a human model of physical stress. *Clin Exp Hypertens* 2008, 30 (8), 720-31.
30. Nieman, D. C., Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 1994, 26 (2), 128-39.
31. Lancaster, G. I.; Halson, S. L.; Khan, Q.; Drysdale, P.; Wallace, F.; Jeukendrup, A. E.; Drayson, M. T.; Gleeson, M., Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev* 2004, 10, 91-106.
32. Gleeson, M.; Bishop, N. C., The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant* 2005, 10 (4), 43-8.