

## EXERCÍCIO DE CORRIDA DE ALTA INTENSIDADE ALTERA A EXPRESSÃO DE THY-1 E ECTONUCLEOTIDASE NA SUPERFÍCIE DE LINFÓCITOS

Marcos Felipe Lopes de Miranda<sup>1</sup>, Ruy Andrade Louzada Neto<sup>1,2</sup>, João Paulo Albuquerque Cavalcanti de Albuquerque<sup>1,2</sup>, Marcelo Baldanza Ribeiro<sup>1,2</sup>, Fabiana Bergamin Muccillo<sup>3</sup>, Denise Pires de Carvalho<sup>2</sup>, Luiz Cláudio Cameron<sup>3</sup>, and João Pedro Werneck-de-Castro.<sup>a,b</sup>

<sup>1</sup>*Escola de Educação Física e Desportos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

<sup>2</sup>*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

<sup>3</sup>*Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro, Brasil.*

<sup>4</sup>*Laboratório de Bioquímica de Proteínas, UNIRIO, Rio de Janeiro, Brasil.*

**Correspondência para:** [joaopedrowerneck@yahoo.com.br](mailto:joaopedrowerneck@yahoo.com.br)

*Submetido em 6 de Maio de 2016*

*Primeira decisão editorial em 20 de Maio de 2016*

*Aceito em 4 de Junho 2016*

### RESUMO

O exercício agudo é um desafio a homeostase e após exercício físico intenso ocorre transiente linfopenia e imunossupressão. As moléculas de adesão celular são expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, tendo um papel fundamental nas interações entre linfócito e endotélio. O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de CD73, CD90 e CD105 em leucócitos após corrida de alta intensidade. Dez homens jovens foram inscritos em uma corrida de 4 km e o sangue foi coletado 60 minutos antes, 5 minutos, 1, 3, 6 e 24 hs após a o exercício, para avaliação hematológica e determinação de marcadores de superfície celulares por citometria de fluxo. Foi utilizado o teste ANOVA de uma via com o teste de Dunnet's como post hoc para a análise estatística. Os dados foram considerados diferentes estatisticamente quando  $p < 0,05$ . Os leucócitos aumentaram 30% e os granulócitos 40 – 70% após 6h de exercício físico. Linfopenia foi observada 1 h após o exercício, como esperado. Monócitos, eosinófilos e basófilos, e outros parâmetros hematológicos não se alteraram. Linfócitos T, linfócitos T helper e células citotóxicas aumentaram em resposta ao exercício. Linfócitos B e as células exterminadoras naturais (natural killers) aumentaram imediatamente após o exercício. A células CD73<sup>+</sup> aumentaram somente imediatamente após o exercício e as células CD90<sup>+</sup> diminuíram 24h após o exercício. Podemos concluir que a corrida de alta intensidade induziu a resposta clássica do sistema imuno-endócrino e é capaz de alterar o número de células CD73<sup>+</sup> e CD90<sup>+</sup>.

## INTRODUÇÃO

O sistema imune é alterado tanto agudamente quanto cronicamente pelo exercício físico (Walsh *et al.*, 2011). Em diversos estudos, o número de neutrófilos circulantes aumenta após o exercício, e se mantêm elevado por horas (Wolach *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2001). Após o exercício, o número de linfócitos no sangue aumenta e depois rapidamente diminui, atingindo níveis bem abaixo dos valores pré-exercício (Starkie *et al.*, 2001; Lancaster *et al.*, 2005). Dependendo da intensidade, o declínio na contagem de linfócitos dura algumas horas, explicando, em parte, a supressão do sistema imune após o exercício (Mooren *et al.*, 2002). Assim, parece que o exercício moderado induz uma imunoestimulação enquanto o exercício intenso provoca uma imunossupressão.

Moléculas de adesão celular (do inglês “cell adhesion molecules”; CAMs), que são expressas na superfície dos leucócitos e das células endoteliais, tem um importante papel na interação celular linfócito-endotélio, regulando a inflamação, contribuindo na marginação das células sanguíneas, endereçamento e recirculação dos linfócitos (Airas *et al.*, 1997). L-seletina (CD62L), LFA-1 (CD11a) and ICAM-1 (CD54) estão presentes na superfície dos linfócitos e tem um importante papel regulatório na interação linfócito-endotélio (Goebel e Mills, 2000). Van Eeden *et al.*, (1999) demonstraram que os linfócitos em desmarginação durante o esforço máximo na bicicleta expressam baixos níveis de L-seletina, altos níveis de densidade de LFA-1 enquanto a densidade de ICAM-1 não é afetada (Van Eeden *et al.*, 1999; Goebel e Mills, 2000).

CD73/ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT), é uma molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) com 70-kDa que pode ser encontrada em diversos tecidos de mamíferos e tipos de células (Airas *et al.*, 1997; Airas *et al.*, 2000) incluindo células endoteliais e subconjuntos de células hematopoiéticas. CD73 cataliza a desfosforilação de nucleotídeos extracelulares em nucleotídeos monofosfato, tais como a adenosina, aumentando a concentração de adenosina extracelular. A expressão de CD73 parece estar envolvida com o controle da ligação do linfócito e/ou funcionando como um co-regulador molecular, nesse caso os sinais mediados através da ligação com CD73 pode levar a uma ativação de outras moléculas de adesão, como LFA-1 (Airas *et al.*, 1997).

CD90/Thy-1 é uma proteína que possui um glicosilfosfatidilinositol (GPI) ancorado, pesa entre 25-37 kDa e é expressa em tímócitos de ratos, células dendríticas epidérmicas, células tronco hematopoiética, células neuronais, fibroblastos e linfócitos T periféricos (Cerasoli *et al.*, 2001). Em tímócitos e células T, CD90 está associado com a regulação de múltiplas funções imunológicas, incluindo reconhecimento célula-célula, adesão, diferenciação de tímócitos em células T, ativação de células T e apoptose (Wajeman-Chao *et al.*, 1998; Rege e Hagood, 2006).

A endoglina (CD105) é uma glicoproteína homodimérica transmembrana de 180 kDa, primariamente expressa nas células endoteliais e é constitutivamente presente na maioria das células T de memória e 30% das células T virgens (Schmidt-Weber *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). Ela é uma proteína auxiliar que atua na interação receptor-ligante de múltiplos membros da super família do TGF-  $\beta$  (do inglês “transforming growth fator”) (Lee *et al.*, 2006).

Apesar da importância dessas moléculas na adesão dos linfócitos, ativação e proliferação, sua expressão não foi investigada em resposta ao exercício. Portanto, o objetivo desse estudo é investigar a expressão dessas moléculas em linfócitos em resposta a uma sessão de corrida de alta intensidade.

## **MÉTODOS**

### ***Sujeitos***

No presente estudo, foram utilizados indivíduos recreacionalmente ativos que correram uma tradicional corrida de revezamento para amadores. Todos os procedimentos foram analisados e aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO (protocolo número 0053.0.313.000-07) para uso de seres humanos em pesquisa. Dez voluntários, jovens adultos do sexo masculino (20 a 35 anos de idade) participaram do estudo. Cada voluntário foi informado sobre os procedimentos experimentais, riscos potenciais e desconforto associado aos experimentos, e assinaram um documento de consentimento. Todos os homens eram aparentemente saudáveis e não reportaram uso de medicamentos e cigarros durante o experimento. Além disso, eles foram impedidos de realizar exercício 72 hs antes da corrida e 24 hs após. Nenhum deles tinha alguma doença muscular ou endócrina, limitação ortopédica, gripe, resfriado ou algum outro tipo de limitação que atrapalhasse os resultados experimentais. Parte do estudo já foi publicado, por exemplo condições da corrida, intensidade do exercício e níveis de cortisol (Neto *et al.*, 2013). O experimento foi realizado em abril durante uma corrida de rua de 40 km na cidade do Rio de Janeiro. Cada sujeito correu 4 km, com o evento tendo início às 8:00 da manhã. A frequência cardíaca foi monitorada durante toda a corrida com a utilização de um monitor cardíaco (Polar, Team System I®).

### ***Coleta de sangue***

O sangue foi coletado pela veia antecubital, usando uma seringa estéril e tubos a vácuo, por uma pessoa familiarizada com o procedimento. Níveis basais foram determinados sessenta minutos antes da corrida. Cinco minutos, 1, 3, 6 e 24h após a corrida, o sangue foi coletado. O período de 5 minutos foi necessário para permitir que cada sujeito chegasse do final da corrida até o centro de coleta de sangue. Foram coletados 5 µl de sangue com EDTA (Vacutainer®) para as medidas hematológicas. A contagem completa do sangue foi feita com um hematocítômetro automático (Coulter T890). Hematócrito, leucócitos, granulócitos, linfócitos e monócitos foram obtidos assim como eritrócitos, hemoglobinas e plaquetas.

### ***Testes laboratoriais***

Os participantes do estudo compareceram ao laboratório uma semana antes da corrida, para realizarem a antropometria e o teste de capacidade aeróbica máxima na parte da manhã (8:00 – 11:00 h). O peso (kg), altura (cm), dobras cutâneas (mm, bíceps, tríceps, axilar, subescapular, peito, supra ilíaca, supra espinhal, abdominal, coxa e panturrilha) foram mensurados. O questionário de prontidão de atividade física (Par-Q) foi aplicado antes do teste de exercício máximo para garantir a ausência de doenças cardiovasculares e o modelo de teste sem exercício proposto por Mathews *et al.*, foi usado para ajudar no planejamento do protocolo de rampa (Matthews *et al.*, 1999).

A captação máxima de oxigênio foi medida através do teste de rampa na esteira, previamente descrito (Cunha *et al.*, 2010). O protocolo de rampa usado tinha os incrementos da inclinação feitos de maneira individualizada para extrair o máximo de tolerância de cada indivíduo durante o tempo do teste (8 a 12 min). A velocidade inicial e o pico de velocidade foram de  $6,3 \pm 0,4$  km/h e  $17,3 \pm 1,5$  km/h, respectivamente. O tempo de exaustão foi de  $11,8 \pm 1,6$  min. O consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>), ventilação pulmonar (VE), produção de dióxido de carbono (VCO<sub>2</sub>), razão de troca respiratória (RER), frequência cardíaca (FC) e pulso de oxigênio (VO<sub>2</sub>/FC) foram coletados, e os dados, as médias, gravados a cada 30 s. As trocas gasosas foram aferidas usando o analisador VO2000 (Medical Graphics, Saint Louis, MO, USA) e a frequência cardíaca foi aferida através de um cardiocômetro (Polar S-810, Kempele, Finland). O analisador de gás foi calibrado com uma mistura padrão de oxigênio

(17,01%) e dióxido de carbono (5,00%), balanceado com nitrogênio. O fluxo e volume do pneumotacógrafo foi calibrado com uma seringa graduada para 3 L de capacidade (Hans Rudolph, Kansas, MO, USA). Os testes foram considerados como máximos se os participantes satisfizessem, pelo menos, três dos quatro critérios a seguir: a) exaustão voluntária máxima, como refletida pelo escore 10 na escala CR-10 de Borg; b) atingir  $\geq 90\%$  da frequência cardíaca máxima (220 - idade) ou presença de platô de FC ( $\Delta$  FC entre duas taxas de trabalho consecutivas  $\leq 4$  batimentos  $\cdot$  min<sup>-1</sup>); c) presença de platô de VO<sub>2</sub> ( $\Delta$ VO<sub>2</sub> entre duas taxas de trabalho consecutivas  $< 2,1$  mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  min<sup>-1</sup>); e d) e uma razão de troca respiratória máxima (RER máx)  $> 1,1$  (Cunha *et al.*, 2010). Os participantes foram encorajados verbalmente e foram proibidos de segurarem na barra lateral e frontal das esteiras.

### ***Análise no citômetro de fluxo***

No intuito de quantificar os marcadores de superfície celular no sangue, alíquotas (50  $\mu$ l) do sangue total foram colocadas em tubos de polistireno com EDTA e incubados durante 15 minutos com um conjugado de anticorpos monoclonais após lise dos eritrócitos. Subpopulações de linfócitos foram determinadas da seguinte forma: Linfócitos T (CD3<sup>+</sup>), linfócitos T helper (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), linfócitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) e células natural killer (NK-CD56<sup>+</sup>) usando o Lymphogram® (Cytognos, Spain). CD73<sup>+</sup> (PE-Cy5; Pharmigen BD), CD90<sup>+</sup> (PE; Pharmigen BD) and CD105<sup>+</sup> (FITC; R&D Systems) foram utilizados para verificar a expressão de Thy-1, ecto-5'-NT endoglina, respectivamente. Todas as incubações foram feitas em uma sala escura e em temperatura ambiente. A aquisição dos dados foi feita através do FACSARIA (BD biosciences) e analisados com o software Paint-a-Gate PRO (BD Biosciences). O número absoluto de linfócitos foi determinado multiplicando as percentagens correspondentes pela contagem total de linfócitos obtidos na contagem do hemograma (Coulter T890). Cada análise consistiu em 100000 eventos. Células CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> and CD105<sup>+</sup> foram analisados junto com a marcação para CD45<sup>+</sup> (APC, BD Biosciences). A citometria de fluxo foi feita antes, logo após, 6 e 24 horas após a corrida.

### ***Mensuração de marcadores de lesão muscular***

Os marcadores de lesão muscular, creatina cinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH), assim como o marcador de lesão hepática, gamma glutamil transferase (GGT), foram analisados. Depois de coagulado, as amostras foram centrifugadas e colocadas no nitrogênio líquido. Ao voltarmos do local da prova para o laboratório, as amostras foram guardadas a -80°C até o dia das análises. Os marcadores de lesão foram estimados pelo kit comercial de ELISA (Bioclin® Quibasa Química Básica Ltda-Brazil).

### ***Análise estatística***

Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A Análise de variância de um entrada (*One-way ANOVA*) seguida de p[os-teste de *Dunnet* foi empregada para determinar possíveis diferenças entre os tempos pós exercício e os valores basais (antes). Nós consideramos diferença significativa quando  $p < 0,05$ . Nós usamos o programa Prisma® para todas as análises de dados.

**RESULTADOS*****Sujeitos e características da corrida***

Todos os dados demográficos e condições de corrida foram previamente descritos (Neto *et al.*, 2013). Os jovens sujeitos inscritos neste presente trabalho são considerados recreacionalmente ativos, baseado no questionário e a frequência cardíaca média foi de  $180 \pm 8$  bpm, consistindo em  $92,8 \pm 7,1$  % da  $FC_{max}$ , sugerindo que o exercício foi realizado com o esforço próximo da capacidade aeróbia máxima (Neto *et al.*, 2013).

***Parâmetros hematológico e contagem de células***

Os leucócitos aumentaram em torno de 30% até 6h após a corrida, e voltaram aos valores basais 24 hs após a corrida (Tabela 1). Os granulócitos aumentaram 40-70% 1, 3 e 6 h após o exercício enquanto que os linfócitos aumentaram significativamente 5 min após a corrida (em torno de 50%) e a linfopenia foi observada 1h após o fim da competição (30% de queda – Tabela 1). O número de monócitos circulantes, eosinófilos, basófilos, não foram diferentes dos valores pré exercício (data não mostrados).

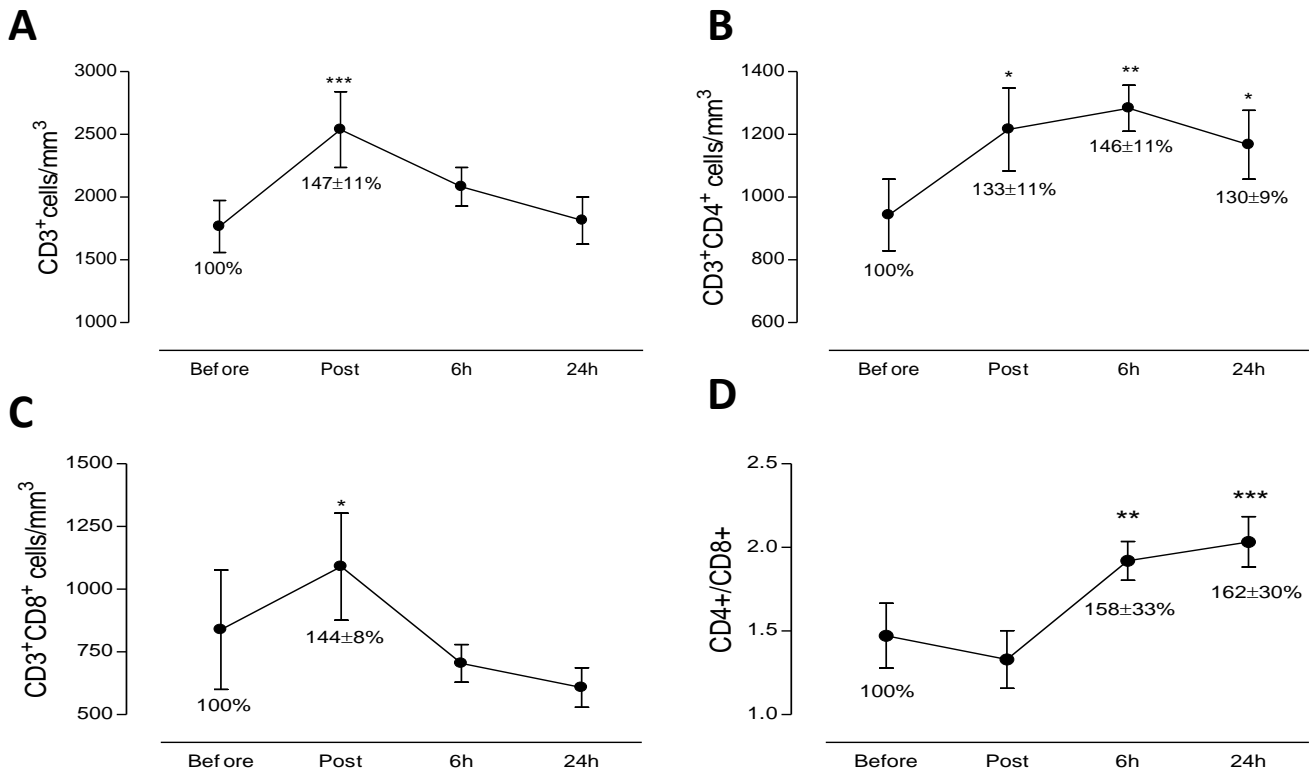
***Tabela 1. Parâmetros hematológicos e contagem de células.***

	<i>Antes</i>	<i>Após</i>	<i>1h</i>	<i>3h</i>	<i>6h</i>	<i>24h</i>
<b><i>Leucócitos (células/mm<sup>3</sup>)</i></b>	<b><i>6695 ± 191</i></b>	<b><i>8840 ± 233***</i></b>	<b><i>8305 ± 97*</i></b>	<b><i>8990 ± 466***</i></b>	<b><i>8190 ± 147*</i></b>	<b><i>6920 ± 153</i></b>
<b><i>Leucócitos (%)</i></b>	<b><i>100%</i></b>	<b><i>133 ± 1.6%</i></b>	<b><i>129 ± 2.2%</i></b>	<b><i>140 ± 8%</i></b>	<b><i>133 ± 1.6%</i></b>	
<b><i>Granulócitos (células/mm<sup>3</sup>)</i></b>	<b><i>3610 ± 111</i></b>	<b><i>4390 ± 141</i></b>	<b><i>5630 ± 86***</i></b>	<b><i>5750 ± 468***</i></b>	<b><i>4810 ± 94*</i></b>	<b><i>3780 ± 107</i></b>
<b><i>Granulócitos (%)</i></b>	<b><i>100%</i></b>		<b><i>164 ± 3.5%</i></b>	<b><i>169 ± 16%</i></b>	<b><i>139 ± 2.8%</i></b>	
<b><i>Linfócitos (células/mm<sup>3</sup>)</i></b>	<b><i>2530 ± 80</i></b>	<b><i>3790 ± 104***</i></b>	<b><i>1964 ± 60*</i></b>	<b><i>2415 ± 246</i></b>	<b><i>2742 ± 55</i></b>	<b><i>2580 ± 65</i></b>
<b><i>Linfócitos (%)</i></b>	<b><i>100%</i></b>	<b><i>153 ± 2.5%</i></b>	<b><i>79 ± 1.6%</i></b>			

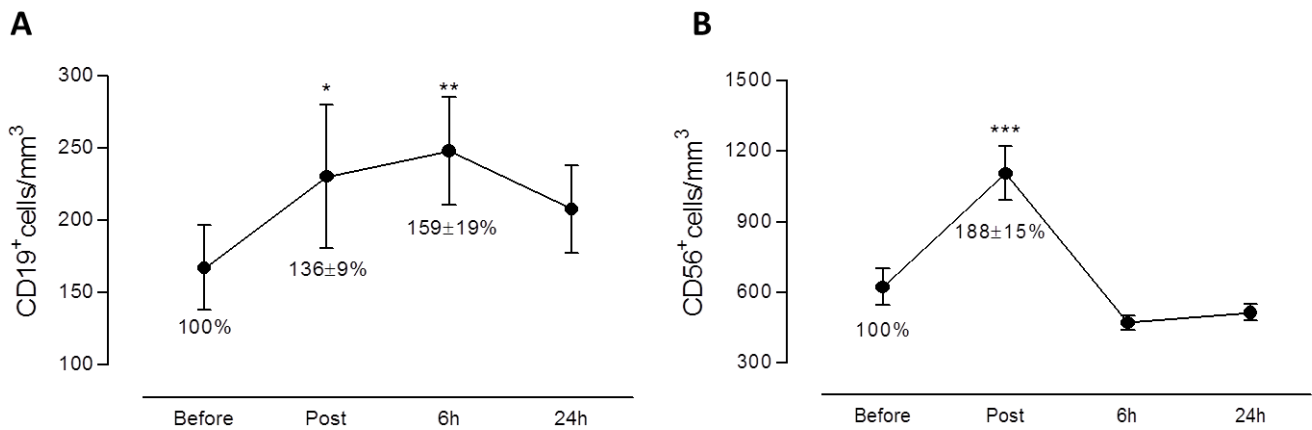
***Valores expressos em média ± EPM. \* P <0.05, \*\* P <0.01 e \*\*\* P <0.001 contra o tempo antes do exercício***

***Análise de citometria de fluxo, cortisol no plasma e marcadores de lesão muscular.***

A análise de citometria de fluxo mostrou que o total de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, linfócitos T helper CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> e linfócitos T citotóxicos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> aumentaram 5 min após a corrida (Figura 1A-C). As células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> aumentaram até 24 hs após a corrida (Figura 1B), conseqüentemente, a razão entre CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> aumentou 6 e 24 hs após a corrida (Figura 1D). Linfócitos B CD19<sup>+</sup> aumentaram somente após 6 hs do final da corrida e retornaram aos valores basais enquanto que as células *natural killers* CD56<sup>+</sup> aumentaram somente logo após a corrida (Figura 2A e 2B).

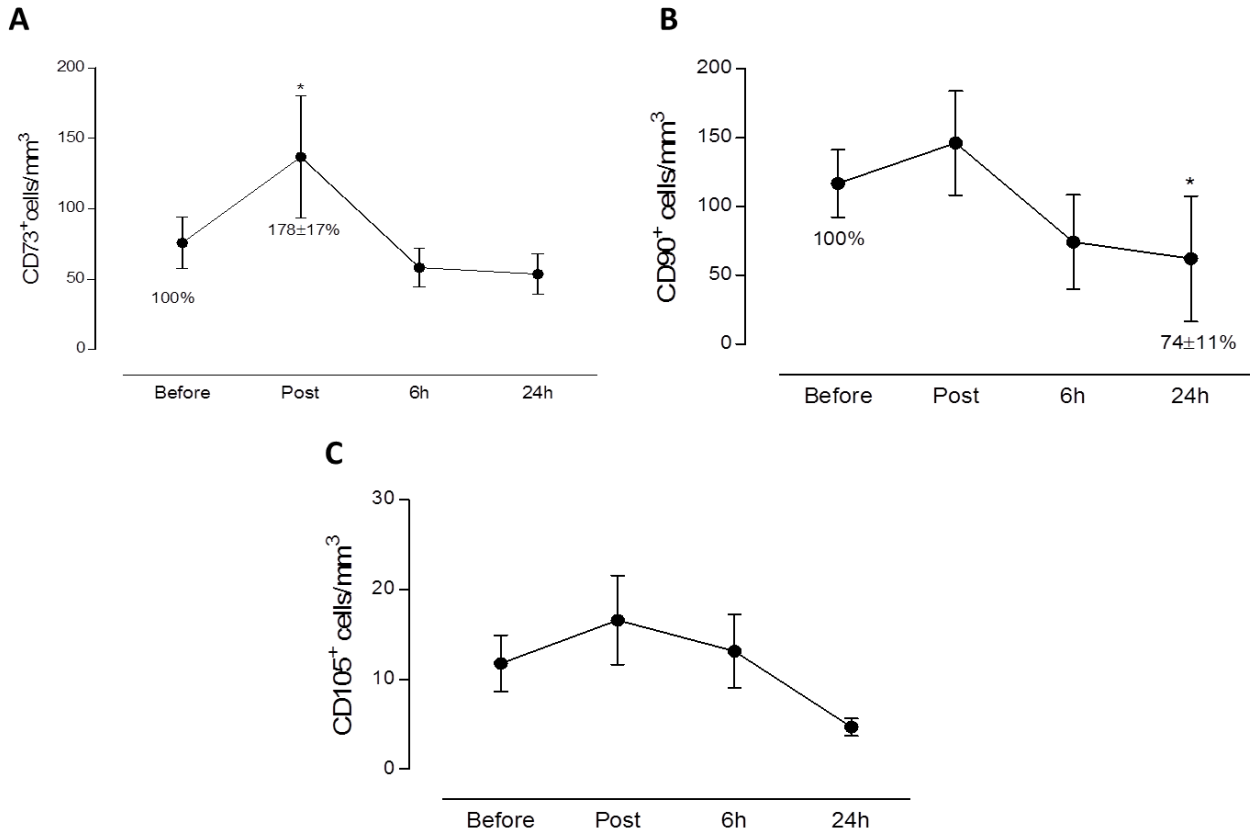


**Figura 1.** (A) CD3<sup>+</sup>; (B) CD4<sup>+</sup>; (C) CD8<sup>+</sup> and (D) Relação CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Após 4km de corrida de alta intensidade. Valores absolutos (células/mm<sup>3</sup>) e normalizados em relação ao basal (100%). \* P <0.05, \*\* P <0.01 e \*\*\* P <0.001 comparados aos valores basais.



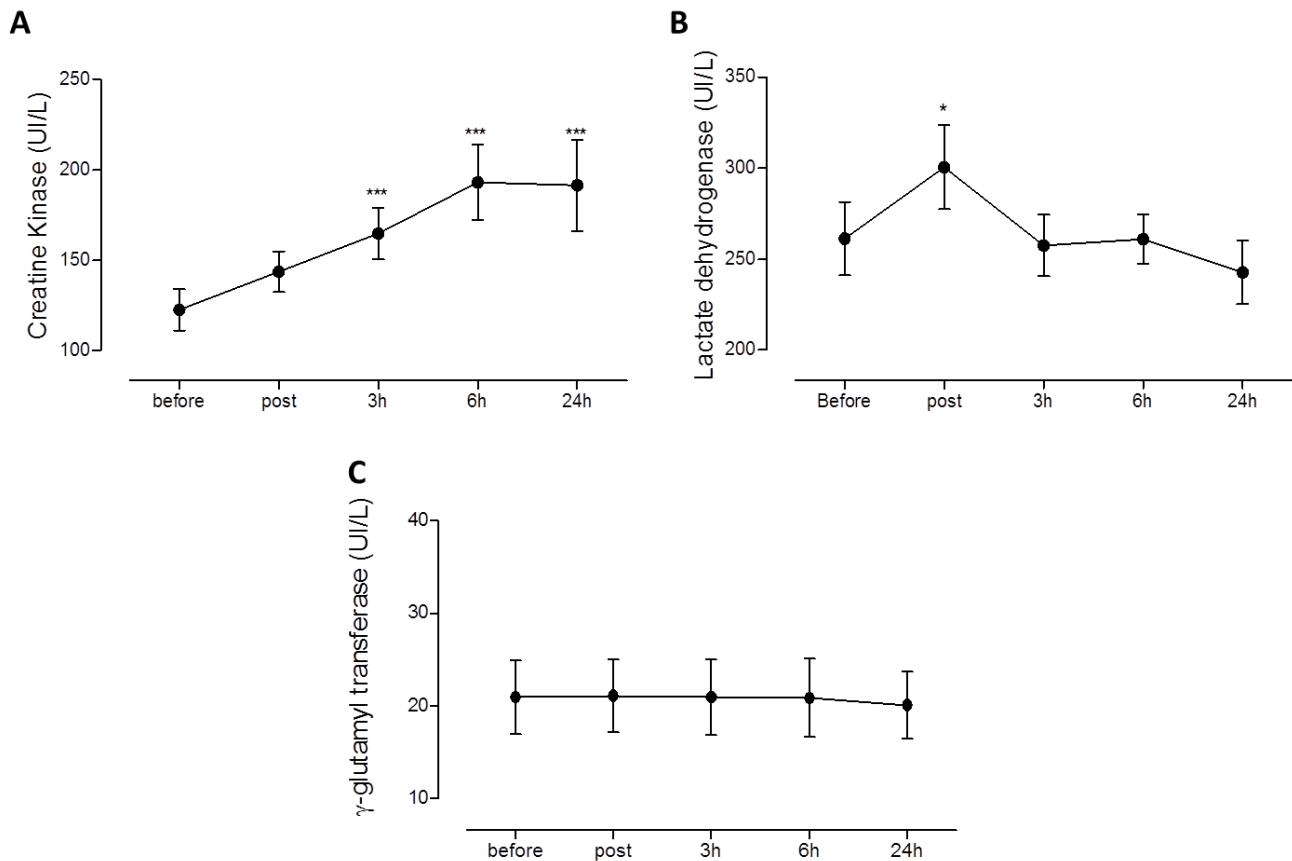
**Figura 2.** Células (A) CD19<sup>+</sup> e (B) CD56<sup>+</sup> antes e depois de 4km de corrida de alta intensidade. Valores absolutos (células/mm<sup>3</sup>) e normalizados pelos valores basais (100%). \* P <0.05, \*\* P <0.01 e \*\*\* P <0.001 comparados aos níveis basais.

O número de células CD73<sup>+</sup> aumentou significativamente logo após o exercício de alta intensidade e retornou aos valores basais nos pontos seguintes (Figura 3A). Entretanto, as células CD90<sup>+</sup> diminuíram 24 hs após a corrida (Figura 3B). As células CD105<sup>+</sup> não se alteraram em nenhum dos tempos analisados após a corrida (Figura 3C).



**Figure 3.** Células (A) CD73<sup>+</sup>; (B) CD90<sup>+</sup> e (C) CD105<sup>+</sup> antes e depois de 4km de corrida de alta intensidade. Absoluto (células/mm<sup>3</sup>) e normalizado pelos valores basais (100%).\* P <0.05 comparado aos níveis basais.

O cortisol plasmático aumentou 71%, 5 min após a corrida e caiu abaixo da linha de base 6 hs após o exercício (Neto *et al.*, 2013). Creatina cinase sanguínea aumentou 3 hs após o exercício e se manteve elevada até 24 h após (Figura 4A). A lactato desidrogenase aumentou apenas imediatamente após o exercício (Figura 4B) e o marcador de lesão hepática, gamma glutamil transferase, não apresentou alterações pelo exercício (Figura 4C).



**Figura 4. Marcadores de lesão muscular.** (A) CK; (B) LDH and (C) GGT em resposta a uma corrida de 4 Km em alta intensidade. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 e \*\*\* P < 0.001 versus antes.

## DISCUSSÃO

Os parâmetros que demonstram que o presente protocolo de exercício usado é de alta intensidade já estão publicados (Neto *et al.*, 2013). Os indivíduos correram acima de 90% da  $FC_{max}$ , denotando, inequivocamente, um modelo de exercício de alta intensidade (Neto *et al.*, 2013). No presente estudo, nós mostramos que a intensidade de exercício é suficiente alta para induzir lesão muscular, observadas por marcadores de lesão muscular sanguíneos, como a CK e LDH (Figura 4). Os resultados desse presente estudo, demonstram que o exercício de corrida em alta intensidade resulta em uma leucocitose, com um aumento dos linfócitos, granulócitos e células *natural killer*, enquanto há uma queda dos linfócitos 1h após a corrida. Isto é uma resposta clássica do sistema imune ao exercício de alta intensidade (Tabela 1). Apesar da linfopenia observada com 1 hora depois do exercício, houve um aumento no número de células que expressavam  $CD3^+$ ,  $CD4^+$  e  $CD19^+$  6 hs após o exercício (Figura 1). Além disso, o exercício aumentou o número de células  $CD73^+$ , mas diminuiu as células  $CD90^+$  (Figura 3). A expressão de  $CD105^+$  não foi afetada pela corrida.

Como esperado, a corrida de alta intensidade aumentou as concentrações de cortisol no sangue e induziu uma linfopenia (Tabela 1 e (Neto *et al.*, 2013)). Está bem descrito na literatura que o exercício físico pode reduzir o número de linfócitos periféricos, devido à apoptose causada pela secreção de glicocorticoides durante o exercício (Yu *et al.*, 1977; Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). Glicocorticoides (GCs) são uma classe de hormônios esteroides que exibem uma potente função imunomodulatória, incluindo a habilidade de induzir a apoptose dos linfócitos T (Herold *et al.*, 2006). Mars *et al* (1998), foi o primeiro a



mostrar que depois de um exercício de rampa na esteira até a exaustão (exercício intenso) houve aumento de apoptose de linfócitos e isso pode ser explicado, em parte, a linfopenia induzida pelo exercício (Mars *et al.*, 1998). Para entender o papel da intensidade do exercício sobre a resposta linfocitária ao exercício, Mooren *et al.* (2002) compararam uma hora de exercício de alta intensidade (80% do  $VO_{2max}$ ) com uma intensidade moderada (60% do  $VO_{2max}$ ), e observou que somente o exercício de alta intensidade foi capaz de induzir concomitantemente uma linfopenia e apoptose de linfócitos. Em contraste, 150 min de exercício na esteira com intensidade moderada a alta (exercício prolongado a 75% do  $VO_{2max}$ ) não causou lesão no DNA de linfócitos nem aumentou a apoptose em atletas bem treinados em corridas de longa distância, apesar de ter aumentado glicocorticoides e a linfopenia (Peters *et al.*, 2006). A intensidade do exercício parece ser fator central na indução de apoptose linfocitária. Nesse contexto, Kruger *et al.*, fizeram um estudo bem elaborado para investigar o papel da intensidade do exercício após um exercício de resistência. Os sujeitos foram inscritos em uma intensa (75% de 1RM – repetição máxima) ou moderada (60% de 1RM) sessão de treinamento de força. Três horas de exercício intenso, mas não no moderado, diminuiu o número de linfócitos e reduziu o conteúdo de Bcl-2; e aumentou o cortisol no sangue e a apoptose dos linfócitos (Kruger *et al.*, 2011). Usando células isoladas, eles demonstraram que mifepristona (MIF) (Sigma), um bloqueador do receptor de glicocorticoide, diminuiu a apoptose induzida pelo aumento do cortisol nos sujeitos que realizaram o exercício intenso.

A expressão da nucleotidase CD73/ecto-5' (ecto-5'-NT) está envolvida no controle da ligação do linfócito e/ou podendo funcionar como uma molécula co-reguladora, que nesse caso, sinais mediados pelo ligante levam a ativação de outras moléculas de adesão como a LFA-1 (Airas *et al.*, 1997). CD73 é altamente expressa na população de linfócitos CD3<sup>+</sup> (32%), CD4<sup>+</sup> (19%), CD8<sup>+</sup> (50%) and CD19<sup>+</sup> (81%) (Thompson *et al.*, 1987). O número de células CD73<sup>+</sup> aumentou logo após a corrida concomitante com a mobilização de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e células NK. Entretanto, células B aumentaram só 6 h após o exercício, enquanto as CD73<sup>+</sup> retornaram aos valores basais. Parece que o exercício induz a mobilização precoce de linfócitos T, células NK e células CD73<sup>+</sup>. Essa mobilização preferencial de linfócitos T pode ser importante para a regeneração do tecido muscular pós lesão induzida por exercício, principalmente na fase de inflamação que ocorre com 24 hs após o exercício (Brancaccio *et al.*, 2008). Em nosso protocolo de exercício, LDH e CK aparecem aumentadas no sangue confirmando lesão muscular (Figuras 4A e 4B).

Nesse contexto, a ativação de CD73 nos linfócitos induz proliferação, secreção de IL-2 e expressão de receptor de IL-2 (IL-2R) (Thompson *et al.*, 1989). Além disso, CD73 regula a adesão dos linfócitos no endotélio (Airas *et al.*, 1995; Arvilommi *et al.*, 1997). Airas *et al.*, (Airas *et al.*, 2000), mostraram que a ativação de CD73/ecto-5'-NT pode induzir a ativação de LFA-1, resultando em um aumento de ligação de linfócitos ao endotélio, agindo de maneira independente das quimiocinas. Assim como ocorre com LFA-1 (Rovere *et al.*, 1996), possivelmente a liberação de catecolaminas durante o exercício pode retirar as moléculas de adesão CD73/ecto-5'-NT de seu receptor promovendo um aumento após o exercício e, desse modo, impedindo a sua migração para o local da lesão. Uma das limitações do nosso estudo é que nós não fizemos a citometria de fluxo em todos os pontos de coleta. Portanto, nós não sabemos se há uma diminuição da expressão de CD73 associada a linfopenia 1 hora após a sessão de exercício.

Por outro lado, as células positivas para CD90/Thy-1 que também são expressas em células tronco mesenquimais e hematopoiéticas, e linfócitos T (Cerasoli *et al.*, 2001), diminuem a longo prazo (24 hs) após uma corrida de alta intensidade. Está bem descrito que as catecolaminas secretadas durante o exercício podem influenciar o sistema imune de diversas maneiras, como a proliferação de linfócitos (Pedersen e Hoffman-Goetz, 2000). As catecolaminas aumentam exponencialmente com a intensidade do exercício, chegando aos

valores de pico acima de 90% da frequência cardíaca máxima (Kjaer *et al.*, 1987). Já foi mostrado que as catecolaminas regulam a expressão de Thy-1 *in vitro* (Wajeman-Chao *et al.*, 1998; Lajevic *et al.*, 2010). Wajeman-Chao *et al.* (1998), demonstrou que as catecolaminas eram imunossuprimidas através vias dependentes de AMPc, levando à desestabilização pós transcricional do RNAm de Thy-1. Talvez isso explique a redução da expressão de Thy-1 após 24 hs do exercício.

Nosso estudo reforça a evidência da “janela aberta” que é caracterizada por uma imunossupressão transiente depois de um exercício agudo intenso, aumentando a suscetibilidade a infecções (Kakanis *et al.*, 2010). Neste trabalho, nós utilizamos indivíduos inscritos em uma corrida de revezamento de 40 km (cada indivíduo correu 4 km) bastante popular no Brasil. De fato, o número de corredores amadores no Brasil vem aumentando de maneira notável, o que torna nossos resultados ainda mais relevantes. O fato de sistema imune ser suprimido após o exercício demanda uma utilização de estratégias para poder minimizar as chances de ocorrer infecções, como exemplo a suplementação com carboidratos e glutamina, volume ótimo de exercício x intensidade, e um repouso suficiente entre os exercícios (Li e Gleeson, 2005; Neto *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2011; Goncalves *et al.*, 2012).

Por fim, o exercício de alta intensidade induz uma resposta clássica do sistema imune e aumenta o número de células CD73<sup>+</sup> e diminui CD90<sup>+</sup>. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investigou a expressão dessas moléculas após o exercício.

#### ***Agradecimentos***

Nós somos gratos ao professor Mário Vaisman da Universidade Federal do Rio de Janeiro por sua colaboração com a determinação dos marcadores de lesão muscular.

#### ***Conflito de interesse***

Todos os autores aprovaram o manuscrito e declararam não haver conflito de interesse.

#### ***Suporte financeiro***

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

#### **REFERÊNCIAS**

AIRAS, L. et al. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. **J Exp Med**, v. 182, n. 5, p. 1603-8, Nov 1 1995.

AIRAS, L.; NIEMELA, J.; JALKANEN, S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. **J Immunol**, v. 165, n. 10, p. 5411-7, Nov 15 2000.

AIRAS, L. et al. Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. **J Cell Biol**, v. 136, n. 2, p. 421-31, Jan 27 1997.

ARVILOMMI, A. M. et al. CD73 mediates lymphocyte binding to vascular endothelium in inflamed human skin. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 1, p. 248-54, Jan 1997. BRANCACCIO, P.

et al. Serum enzyme monitoring in sports medicine. **Clin Sports Med**, v. 27, n. 1, p. 1-18, vii, Jan 2008.

CERASOLI, D. M.; KELSOE, G.; SARZOTTI, M. CD4+Thy1- thymocytes with a Th-type 2 cytokine response. **Int Immunol**, v. 13, n. 1, p. 75-83, Jan 2001.

CUNHA, F. A. et al. Influence of cardiopulmonary exercise testing protocol and resting VO(2) assessment on %HR(max), %HRR, %VO(2max) and %VO(2)R relationships. **Int J Sports Med**, v. 31, n. 5, p. 319-26, May 2010.

GOEBEL, M. U.; MILLS, P. J. Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. **Psychosom Med**, v. 62, n. 5, p. 664-70, Sep-Oct 2000.

GONCALVES, L. C. et al. A sportomics strategy to analyze the ability of arginine to modulate both ammonia and lymphocyte levels in blood after high-intensity exercise. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 9, n. 1, p. 30, 2012.

HEROLD, M. J.; MCPHERSON, K. G.; REICHARDT, H. M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. **Cell Mol Life Sci**, v. 63, n. 1, p. 60-72, Jan 2006.

KAKANIS, M. W. et al. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. **Exerc Immunol Rev**, v. 16, p. 119-37, 2010.

KJAER, M.; SECHER, N. H.; GALBO, H. Physical stress and catecholamine release. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v. 1, n. 2, p. 279-98, May 1987.

KRAUSE, R. et al. Effect of vitamin C on neutrophil function after high-intensity exercise. **Eur J Clin Invest**, v. 31, n. 3, p. 258-63, Mar 2001.

KRUGER, K. et al. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. **J Appl Physiol**, v. 110, n. 5, p. 1226-32, May 2011.

LAJEVIC, M. D. et al. Thy-1 mRNA destabilization by norepinephrine a 3' UTR cAMP responsive decay element and involves RNA binding proteins. **Brain Behav Immun**, Apr 20 2010.

LANCASTER, G. I. et al. Effect of prolonged exercise and carbohydrate ingestion on type 1 and type 2 T lymphocyte distribution and intracellular cytokine production in humans. **J Appl Physiol**, v. 98, n. 2, p. 565-71, Feb 2005.

LEE, S. H. et al. Endoglin (CD105) is a target for an oral DNA vaccine against breast cancer. **Cancer Immunol Immunother**, v. 55, n. 12, p. 1565-74, Dec 2006.

LI, T. L.; GLEESON, M. The effects of carbohydrate supplementation during repeated bouts of prolonged exercise on saliva flow rate and immunoglobulin A. **J Sports Sci**, v. 23, n. 7, p. 713-22, Jul 2005.

MARS, M. et al. High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? **Biochem Biophys Res Commun**, v. 249, n. 2, p. 366-70, Aug 19 1998.

MATTHEWS, C. E. et al. Classification of cardiorespiratory fitness without exercise testing. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 3, p. 486-93, Mar 1999.

MOOREN, F. C. et al. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **J Appl Physiol**, v. 93, n. 1, p. 147-53, Jul 2002.

NETO, J. C. et al. Importance of exercise immunology in health promotion. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1165-72, Nov 2011.

NETO, R. A. et al. Decreased Serum T3 after an Exercise Session is Independent of Glucocorticoid Peak. **Horm Metab Res**, Aug 5 2013.

PEDERSEN, B. K.; HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1055-81, Jul 2000.

PETERS, E. M. et al. Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. **Eur J Appl Physiol**, v. 98, n. 2, p. 124-31, Sep 2006.

REGE, T. A.; HAGOOD, J. S. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 10, p. 991-9, Oct 2006.

ROVERE, P. et al. Feedback modulation of ligand-engaged alpha L/beta 2 leukocyte integrin (LFA-1) by cyclic AMP-dependent protein kinase. **J Immunol**, v. 156, n. 6, p. 2273-9, Mar 15 1996.

SCHMIDT-WEBER, C. B. et al. TGF- $\beta$  signaling of human T cells is modulated by the ancillary TGF- $\beta$  receptor endoglin. **Int Immunol**, v. 17, n. 7, p. 921-30, Jul 2005.

STARKIE, R. L.; ROLLAND, J.; FEBBRAIO, M. A. Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 281, n. 4, p. C1233-40, Oct 2001.

THOMPSON, L. F. et al. Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. **J Immunol**, v. 143, n. 6, p. 1815-21, Sep 15 1989.

THOMPSON, L. F. et al. Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies. **J Immunol**, v. 139, n. 12, p. 4042-8, Dec 15 1987.

VAN EEDEN, S. F. et al. Expression of the cell adhesion molecules on leukocytes that demarginate during acute maximal exercise. **J Appl Physiol**, v. 86, n. 3, p. 970-6, Mar 1999.

WAJEMAN-CHAO, S. A. et al. Mechanism of catecholamine-mediated destabilization of messenger RNA encoding Thy-1 protein in T-lineage cells. **J Immunol**, v. 161, n. 9, p. 4825-33, Nov 1 1998.

WALSH, N. P. et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. **Exerc Immunol Rev**, v. 17, p. 6-63, 2011.

WOLACH, B. et al. Neutrophil function response to aerobic and anaerobic exercise in female judoka and untrained subjects. **Br J Sports Med**, v. 34, n. 1, p. 23-8, Feb 2000.

YU, D. T.; CLEMENTS, P. J.; PEARSON, C. M. Effect of corticosteroids on exercise-induced lymphocytosis. **Clin Exp Immunol**, v. 28, n. 2, p. 326-31, May 1977.

## HIGH INTENSITY RUNNING EXERCISE ALTERS BOTH THY-1 AND ECTO-NUCLEOTIDASE EXPRESSION ON LYMPHOCYTES SURFACE.

Marcos Felipe Lopes de Miranda<sup>1</sup>, Ruy Andrade Louzada Neto<sup>1,2</sup>, João Paulo Albuquerque Cavalcanti de Albuquerque<sup>1,2</sup>, Marcelo Baldanza Ribeiro<sup>1,2</sup>, Fabiana Bergamin Muccillo<sup>3</sup>, Denise Pires de Carvalho<sup>2</sup>, Luiz Cláudio Cameron<sup>3</sup>, and João Pedro Werneck-de-Castro<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>*Escola de Educação Física e Desportos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

<sup>2</sup>*Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

<sup>3</sup>*Instituto Nacional de Cardiologia, Rio de Janeiro, Brasil.*

<sup>4</sup>*Laboratório de Bioquímica de Proteínas, UNIRIO, Rio de Janeiro, Brasil.*

**Correspondence to:** [joaopedrowerneck@yahoo.com.br](mailto:joaopedrowerneck@yahoo.com.br)

*Submitted in May 6th 2016*

*First editorial decision in May 20th 2016*

*Accepted in June 4th 2016*

### ABSTRACT

Acute exercise is a challenge to the homeostasis and after intense exercise there is a transient lymphopenia and immunosuppression. The cell adhesion molecules are expressed on the surface of leukocytes and endothelial cells, and play a fundamental role in lymphocyte-endothelial interactions. The aim of the present study was to evaluate the expression of CD73, CD90 and CD105 in leukocytes after a high intensity running exercise. Ten young men were enrolled in a 4 km race and blood was collected 60 min before, 5 minutes, 1, 3, 6 and 24 h after exercise to hematological measurements and cell surface markers determination by flow cytometry. One-way Analysis of Variance with repeated measures and Dunnet's post hoc test were applied as statistical analysis. We set significant difference at  $p < 0.05$ . Leukocytes increased by 30% up to 6h after exercise and granulocytes increased 40-70% over the same period. Lymphopenia was observed 1h after exercise as expected. Monocytes, eosinophils and basophils, and other hematologic parameters did not change. T lymphocytes, T helper and cytotoxic cells increased in response to exercise. B lymphocytes and natural killer cells increased immediately after exercise. The CD73+ cells increased only immediately after exercise while CD90+cells decreased 24h after exercise. In conclusion, high intensity running induced a classic response of the endocrine-immune systems and was able to alter the number of CD73+ and CD90+ cells.

## INTRODUCTION

The immune system is altered both acutely and chronically by exercise training (Walsh et al., 2011). In several studies the number of circulating neutrophils is increased after exercise, and their number may remain high for several hours (Wolach et al., 2000; Krause et al., 2001). After exercise, the number of blood lymphocytes is increased and then decreases rapidly to a level well below the pre-exercise values (Starkie et al., 2001; Lancaster et al., 2005). Depending on the intensity, this decline in lymphocyte counts may last for several hours, explaining, at least in part, the post exercise immune suppression (Mooren et al., 2002; Kakanis et al., 2010). Taken together, it seems that moderate exercise triggers an immunostimulation whereas intense exercise elicits an immunosuppression.

Cell adhesion molecules (CAMs), which are expressed on the surface of leukocytes and endothelial cells, play a pivotal role in lymphocyte-endothelial cell interaction, regulating inflammation and contributes to blood cells margination and lymphocytes homing and recirculation (Airas et al., 1997). L-selectin (CD62L), LFA-1 (CD11a) and ICAM-1 (CD54) on the surface of lymphocytes play an important role in this lymphocyte-endothelial cell interaction (Goebel & Mills, 2000). Van Eeden et al., (1999) showed that lymphocytes that demarginate during maximal effort in bicycle ergometer express low levels of L-selectin, high levels of LFA-1 density while ICAM-1 density was unaffected (van Eeden et al., 1999; Goebel & Mills, 2000).

CD73/ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT), is a 70-kDa glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-linked molecule which can be detected in several different mammalian tissues and cell types (Airas et al., 1997; Airas et al., 2000) including endothelial and subsets of hematopoietic cells. CD73 catalyzes the dephosphorylation of extracellular nucleoside monophosphates into nucleosides such as adenosine, increasing extracellular adenosine concentration. The CD73 expression has been shown to be involved in the control of lymphocyte binding and/or could function as a co-regulatory molecule, in which case signals mediated by ligand binding to CD73 might lead to activation of other adhesion molecules as LFA-1 (Airas et al., 1997).

CD90/Thy-1 is a 25–37 kDa glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein expressed in thymocytes of rats, epidermis dendritic cells, hematopoietic stem cells, neuronal cells, fibroblasts and peripheral T lymphocytes (Cerasoli et al., 2001). In thymocytes and T cells CD90 is associated with multiple roles in immune cell function including cell-cell recognition, adhesion, differentiation of thymocytes into T cells, T cell activation and apoptosis (Wajeman-Chao et al., 1998; Rege & Hagood, 2006).

Endoglin (CD105) is a 180-kDa homodimeric transmembrane glycoprotein, primarily expressed on endothelial cells and is constitutively present in most of the memory T cells and in 30% of the naive T cells (Schmidt-Weber et al., 2005; Lee et al., 2006). It acts as an auxiliary protein that interacts with the ligand-binding receptors of multiple members of the transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) super-family (Lee et al., 2006).

Despite the importance of these molecules in lymphocytes adhesion, activation and proliferation, their expression has not been investigated in response to exercise. Therefore, the objective of this study is to investigate the expression of these molecules in lymphocytes in response to a bout of high intensity of running exercise.

## **METHODS**

### ***Subjects***

We used in the present work recreationally active subjects engaged in a traditional relay race for amateurs. All the experimental procedures were carried out under the approval of the ethical committee of Federal University of the State of Rio de Janeiro – UNIRIO (protocol number 0053.0.313.000-07) for the use of human subject in research. Ten young adult male volunteers (20 to 35 years old) participated in the study. Each subject was informed about the experimental procedures, potential risks, and discomfort associated with the investigation, and signed an informed consent document. All men were apparently healthy and reported no use of medications and cigarettes during the experiment. Furthermore, they avoided exercise during the 72 h before the race and the next 24 h. None of them has muscle and/or endocrine disorders, orthopedic limitation, flu, colds and any type of limitation that would confound experimental results. The experiment was done in April during a 40km street relay race performed at Rio de Janeiro city. Each subject ran 4km starting at 8:00 a.m. Heart rate was monitored throughout the entire race by the Polar cardiometer (Team System I®). Part of this study is already published elsewhere, e.g. race conditions, exercise intensity and cortisol levels (Neto et al., 2013)

### ***Blood collection***

The blood was collected from the antecubital vein using sterile needles and vacuum tubes by a familiarized person. Basal levels were determined sixty minutes before the race. Five minutes and one, three, six, twenty-four h after the race, the blood was collected. The five minutes period was necessary to allow the subject to arrive to the mobile center of blood collection. Five milliliters of blood were collected with EDTA (Vacuteiner ®) for hematological measurements. Complete blood count was made using an automatic hematology analyzer (Coulter T890). Hematocrit, leukocytes, granulocytes, lymphocytes, and monocytes were obtained as well as erythrocytes, hemoglobin and platelets.

### ***Laboratory tests***

Participants presented to the laboratory one week before the race for anthropometric and maximum aerobic capacity assessments always in the morning (8:00 to 11:00 a.m.). The weight (kg), height (cm), skin folds (mm; bicipital, triceps, axillary, subscapular, chest, supriliac, supra-spinal, abdominal, thigh and calf) were measured. The Physical Activity Readiness Questionnaire (Par-Q) was applied before maximal exercise test to ensure absence of cardiovascular disease and the non-exercise model proposed by Matthews et al. was used to help design the ramp protocol (Matthews et al., 1999).

Maximum oxygen uptake was evaluated through a treadmill exercise ramp test previously described (Cunha et al., 2010). The ramp protocol incorporated workload increments that were individualized to elicit the subject's limit of tolerance within the test duration (8 to 12 min). The initial test speed and the peak speed were, respectively,  $6.3 \pm 0.4$  km/h and  $17.3 \pm 1.5$  km/h. Time to exhaustion was  $11.8 \pm 1.6$  min. Oxygen uptake ( $\dot{V}O_2$ ), pulmonary ventilation ( $\dot{V}E$ ), carbon dioxide output ( $\dot{V}CO_2$ ), respiratory exchange rate (RER), heart rate (HR), and oxygen pulse ( $\dot{V}O_2/HR$ ) data were calculated, averaged, and recorded every 30s. Gas exchanges were assessed using a VO2000 analyzer (Medical Graphics, Saint Louis, MO, USA) and the heart rate using a cardiometer (Polar S-810, Kempele, Finland). The gas analyzers were calibrated with a certified standard mixture of oxygen (17.01%) and carbon dioxide (5.00%), balanced with nitrogen. The flows and volumes of the pneumotachograph were calibrated with a syringe graduated for a 3 L capacity (Hans Rudolph, Kansas, MO, USA). The tests were considered as maximal if the participants satisfied at least three of the four following criteria: a) maximum voluntary exhaustion as



reflected by the score 10 in the Borg CR-10 scale; b)  $\geq 90\%$  predicted HR max ( $220 - \text{age}$ ) or presence of a HR plateau ( $\Delta \text{HR}$  between two consecutive work rates  $\leq 4 \text{beats} \cdot \text{min}^{-1}$ ); c) presence of a  $\text{VO}_2$  plateau ( $\Delta \text{VO}_2$  between two consecutive work rates  $< 2.1 \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ); and d) a maximal respiratory exchange ratio ( $\text{RER}_{\text{max}} > 1.1$ ) (Cunha et al., 2010). The participants were verbally encouraged and holding onto the side or front bars of the treadmill was not permitted.

Flow cytometer analysis.

In order to evaluate blood cells surface markers, aliquots (50 $\mu\text{l}$ ) of whole blood in EDTA were added to polystyrene tubes and incubated during 15 min with the following of conjugated monoclonal antibodies after erythrocytes lysis. Lymphocyte subpopulations were determine as follows: T lymphocytes (CD3+), T helper lymphocytes (CD3+CD4+), T citotoxic lymphocytes (CD3+CD8+), B lymphocytes (CD19+) and Natural killer cells (NK-CD56+) using Lymphogram® (Cytognos, Spain). CD73+ (PE-Cy5; Pharmigen BD), CD90+ (PE; Pharmigen BD) and CD105+ (FITC; R&D Systems) were employed to verify the expression of Thy-1, ecto-5'-NT and Endoglin, respectively. All incubations took place at room temperature in the dark. Data acquisitions were performed on a FACSAria (BD Biosciences) and analyses were performed with the Paint-a-Gate PRO software (BD Biosciences). Absolute numbers of lymphocyte subsets were determined by multiplying the corresponding percentages by the total lymphocyte count obtained through hemogram (Coulter T890). Each analysis consisted of 100.000 events. CD90+, CD73+ and CD105+ cells were plotted against CD45+ (APC; BD Biosciences). Flow cytometer procedures occurred before, right after, 6 and 24 h after the race.

### ***Measurement muscle damage markers***

The muscle damage markers creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and gamma glutamyl transferase (GGT) were assessed. After clotting, the samples were centrifuged and stored in liquid nitrogen. When we arrived back to the lab, the samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the assay. The damage markers were evaluated by ELISA commercial Kits (Bioclin® Quibasa Química Básica Ltda-Brazil).

### ***Statistical analysis***

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Repeated measures ANOVA (Analysis of variance) was applied as statistical technique to determine possible differences between the exercise time points and baseline (before) values with the Dunnet's post hoc test. We set significant difference at  $p < 0.05$ . We used graphpad Prism® for all data analysis.

## **RESULTS**

### ***Subjects and race characteristics***

All demographic data and race conditions are previously described (Neto et al., 2013). Young subjects enrolled in the present work are considered recreationally active based on their and the mean heart rate was  $180 \pm 8$  bpm consisting of  $92.8 \pm 7.1\%$  of the HRmax, suggesting that exercise was achieved with effort near maximum aerobic capacity (Neto et al., 2013).

### ***Hematological parameters and cell counts***

Leukocytes increased around 30% by up 6 h after race, and then returned to basal values 24 h after the race (Table 1). Granulocytes enhanced 40-70% 1, 3 and 6 h after exercise whereas Lymphocyte increased significantly 5 min after the race (around 50%) and lymphopenia was observed 1h after the end of the competition (30% of decrease – Table 1). The circulating number of monocytes, eosinophils, basophils, was not different from pre-

exercise values (data not shown). All other hematological parameters did not change (data not shown).

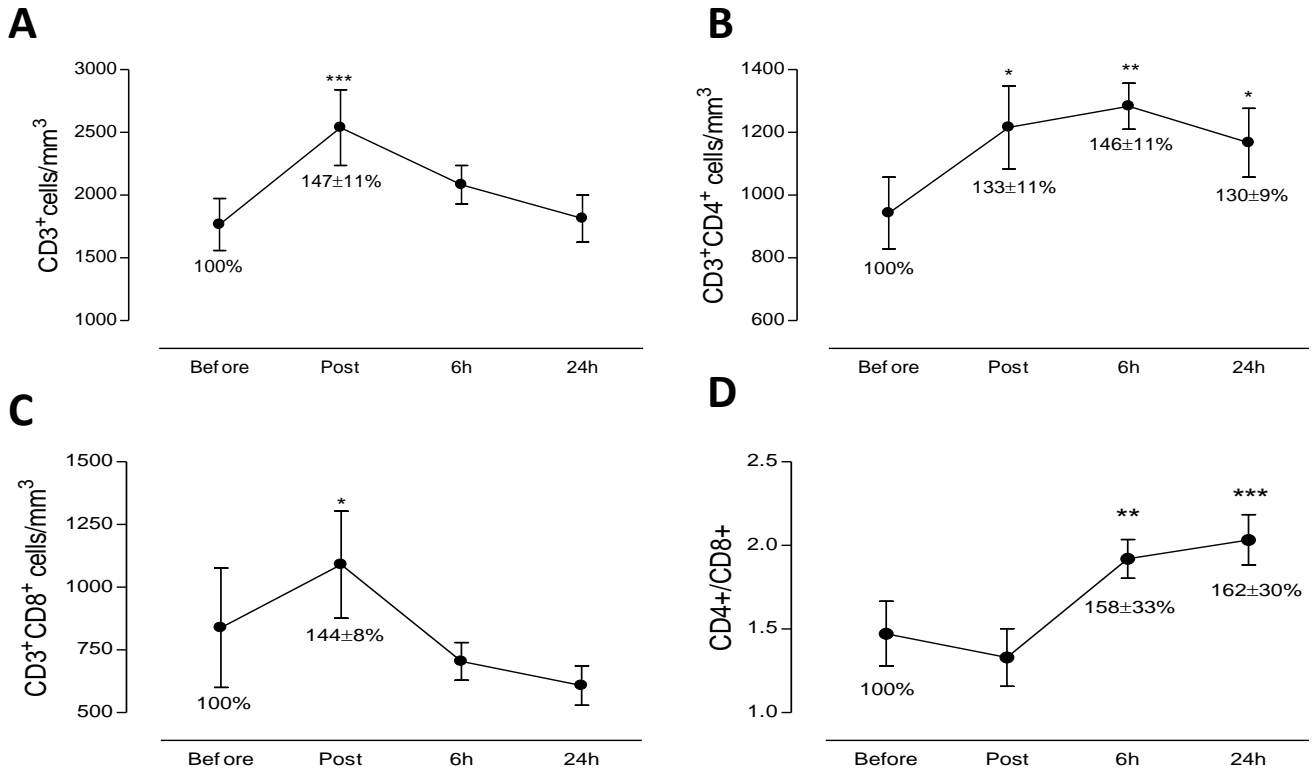
**Table 1. Hematological parameters and cell counts.**

	<i>Before</i>	<i>Post</i>	<i>1h</i>	<i>3h</i>	<i>6h</i>	<i>24h</i>
<i>Leukocytes</i> (cells/mm <sup>3</sup> )	6695 ± 191	8840 ± 233***	8305 ± 97*	8990 ± 466***	8190 ± 147*	6920 ± 153
<i>Leukocytes (%)</i>	100%	133 ± 1.6%	129 ± 2.2%	140 ± 8%	133 ± 1.6%	
<i>Granulocytes</i> (cells/mm <sup>3</sup> )	3610 ± 111	4390 ± 141	5630 ± 86***	5750 ± 468***	4810 ± 94*	3780 ± 107
<i>Granulocytes</i> (%)	100%		164 ± 3.5%	169 ± 16%	139 ± 2.8%	
<i>Lymphocytes</i> (cells/mm <sup>3</sup> )	2530 ± 80	3790 ± 104***	1964 ± 60*	2415 ± 246	2742 ± 55	2580 ± 65
<i>Lymphocytes</i> (%)	100%	153 ± 2.5%	79 ± 1.6%			

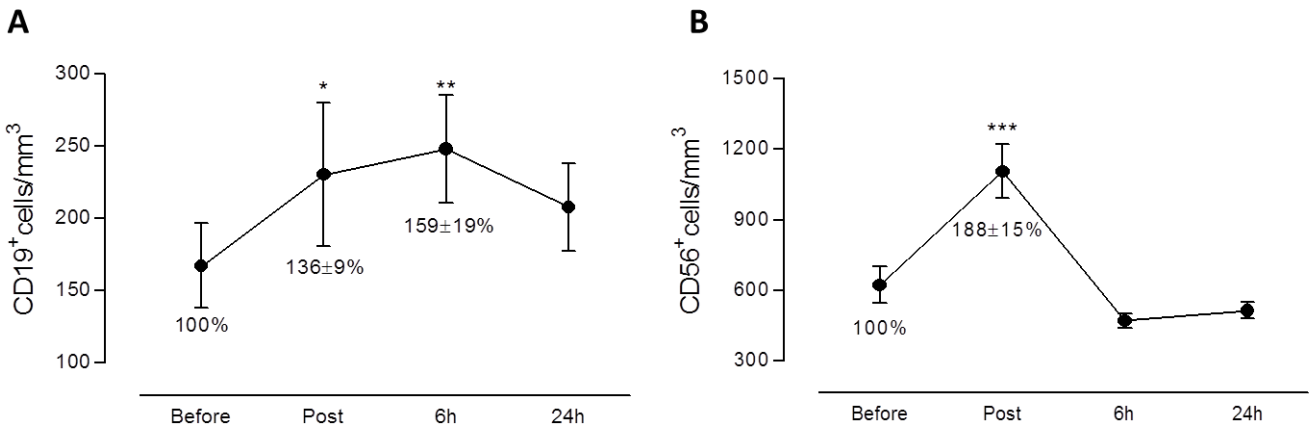
Values are expressed in mean ± SEM. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  versus before

#### **Flow cytometer analysis, plasma cortisol and muscle damage markers**

Flow cytometric analysis showed that total CD3<sup>+</sup> T lymphocytes, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cytotoxic lymphocytes increased 5 min after race (Figure 1A-C). CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells increased up to 24 h (Figure 1B), consequently the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio increased 6 and 24 h after the race (Figure 1D). CD19<sup>+</sup> B lymphocytes increased only 6 h after the exercise and returned to basal values while CD56<sup>+</sup> natural killer cells increased only right after race (Figures 2A and B).

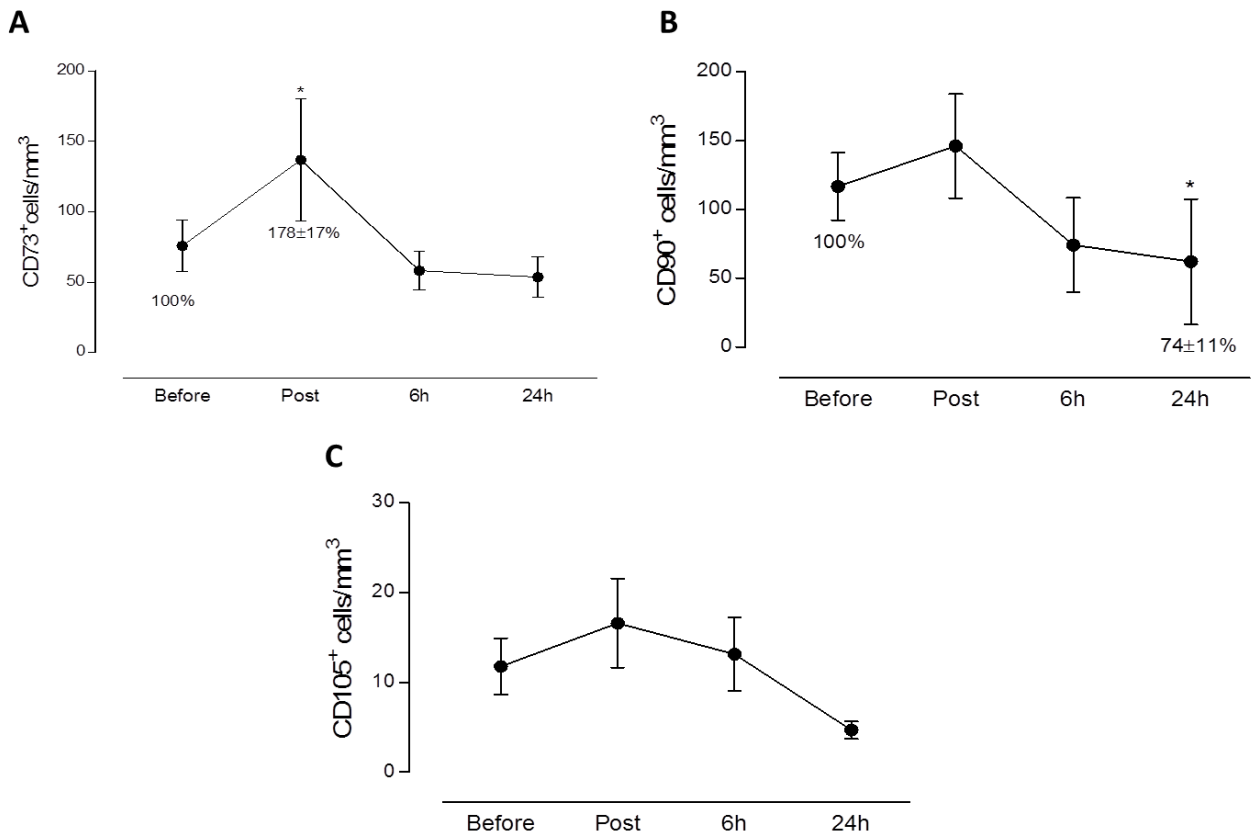


**Figure 1.** (A) CD3<sup>+</sup>; (B) CD4<sup>+</sup>; (C) CD8<sup>+</sup> and (D) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio cells after 4km high intensity running. Absolute (cells/mm<sup>3</sup>) and normalized values to basal (100%) time point are shown. \* P <0.05, \*\* P <0.01 and \*\*\* P <0.001 compared to basal levels.



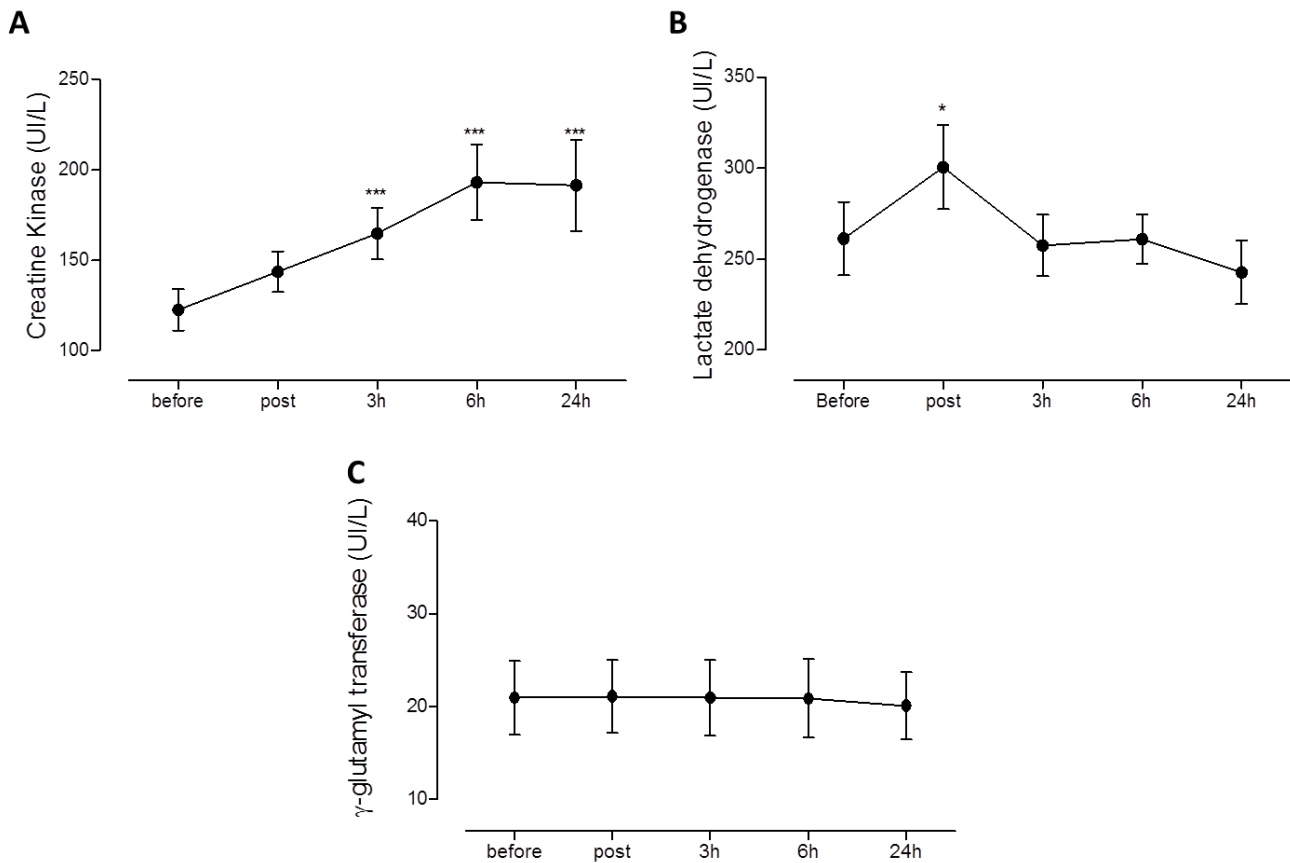
**Figure 2.** (A) CD19<sup>+</sup> and (B) CD56<sup>+</sup> cells before and after 4km high intensity running. Absolute (cells/mm<sup>3</sup>) and normalized values to basal (100%) time point are shown. \* P <0.05, \*\* P <0.01 and \*\*\* P <0.001 compared to basal levels.

The number of CD73<sup>+</sup> cells was significantly increased immediately after the high intensity exercise and returned to base line levels (Figure 3A). However, CD90<sup>+</sup> cells reduced 24 h after the race (Figure 3B). CD105<sup>+</sup> did not change at any time after the race (Figure 3C).



**Figure 3.** (A) CD73<sup>+</sup>; (B) CD90<sup>+</sup> and (C) CD105<sup>+</sup> cells before and after 4 km high intensity running. Absolute (cells/mm<sup>3</sup>) and normalized values to basal (100%) time point are shown.\* P < 0.05 compared to basal levels.

Plasma cortisol increased 71% five min post-race and fell under base line values 6 h after exercise (Neto et al., 2013). Serum creatine kinase increase 3h after the race and remain increased until 24h post exercise (Figure 4A). Lactate dehydrogenase was increased only immediately after the exercise (Figure 4B) and the hepatic damage marker, gamma glutamyl transferase, did not change (Figure 4C).



**Figure 4.** Serum muscle damage markers. **(A)** CK; **(B)** LDH and **(C)** GGT levels in response to the 4 km high intensity race. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$  versus before.

## DISCUSSION

The parameters showing that the present exercise protocol used is of high intensity are already published elsewhere (Neto et al., 2013). Subjects performed the race above 90% of HRmax, denoting unequivocally a model of high endurance exercise (Neto et al., 2013). Here we show that the exercise intensity was high enough to induce skeletal muscle damage as assessed by muscle markers in blood, e.g. CK and LDH (Fig 4). The results from the present study demonstrate that strenuous running exercise resulted in a leukocytosis, with increases in lymphocytes, granulocytes and natural killer cells, while lymphocytes decreased 1 hour after the race. This is a classical response of immune system against high intensity exercise (Table 1). Despite lymphopenia observed with 1 hour after the exercise, there was an increase in the number of cells expressing CD3+, CD4+ and CD19+ at 6 h after exercise (Fig 1). Furthermore, exercise increased the number of CD73+ cells, but decreased CD90+ cells (Fig 3). The expression of CD105+ was unaffected by the race.

As expected the race at high intensity increased concentrations of cortisol in the blood and induced lymphopenia (Table 1 and (Neto et al., 2013)). It has been well described in the literature that physical exercise can reduce the number of peripheral lymphocytes, due to apoptosis, caused by the secretion of glucocorticoids during exercise (Yu et al., 1977; Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Glucocorticoids (GCs) are a class of steroid hormones that display a potent immunomodulatory function, including the weight-bearing ability to

induce T lymphocyte apoptosis (Herold et al., 2006). Mars et al (1998) were the first to show that after a ramp treadmill exercise to exhaustion (intense exercise) lymphocyte apoptosis increased and could explain, at least in part, exercise induced-lymphopenia (Mars et al., 1998). To understand the role of exercise intensity over lymphocyte response after exercise, Mooren et al. (2002) compared an hour of exercise at high (80% of VO<sub>2</sub>max) and moderate (60% of VO<sub>2</sub>max) intensities, and observed that only the high-intensity exercise was able to induce concomitantly lymphopenia and lymphocyte apoptosis. In contrast, 150 min of treadmill exercise with moderate to high intensity (Prolonged exercise at 75% of VO<sub>2</sub>max) did not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes despite an increase in glucocorticoids and lymphopenia (Peters et al., 2006). It seems that exercise intensity is central to induce lymphocyte apoptosis. In this context, Kruger et al performed a well-designed study to investigate the role of exercise intensity after resistance exercise. Subjects were enrolled to an intense (75% of the 1RM – Repetition maximum) or moderate (60% of the 1RM) strength training session. Three hours of intense but not moderate exercise decreased lymphocytes and reduced Bcl-2 content; and increased serum cortisol and lymphocyte apoptosis (Kruger et al., 2011). Using isolated cells, they demonstrated that mifepristone (MIF) (Sigma), a glucocorticoid-receptor blocker, attenuated apoptosis induced by serum cortisol from intense exercised subjects.

CD73/ecto-5'-nucleotidase (ecto-5'-NT) expression is involved in the control of lymphocyte binding and/or could function as a co-regulatory molecule, in which case signals mediated by ligand binding to CD73 might lead to activation of other adhesion molecules as LFA-1 (Airas et al., 1997). CD73 is highly expressed in lymphocyte population as CD3+ (32%), CD4+ (19%), CD8+ (50%) and CD19+ (81%) (Thompson et al., 1987). The number of CD73+ cells increased right after the race concomitantly with the mobilization of CD3+, CD4+ and CD8+ T lymphocytes and NK cells. However, B cells increased only 6 h after exercise, while CD73+ returned to basal levels. It seems that exercise induces early T lymphocytes and NK mobilization and CD73+ cells. This preferential T lymphocyte mobilization can be important for muscle tissue regeneration after exercise-induced muscle injury mainly during the inflammation phase which occurs within h after exercise (Brancaccio et al., 2008). In our exercise protocol, LDH and CK appearance in blood were augmented confirming skeletal muscle damage (Figures 4 A and B).

In this context, activation of CD73 in lymphocytes induced proliferation, IL-2 secretion and expression of IL-2 receptor (IL-2R) (Thompson et al., 1989). Besides CD73 regulates lymphocyte adhesion to endothelium (Airas et al., 1995; Arvilommi et al., 1997). Airas et al. (Airas et al., 2000) showed that activation of CD73/ecto-5'-NT can induce activation of LFA-1, thereby resulting in an increased binding of lymphocytes to the endothelium, acting independently of chemokines. Just as occurs with LFA-1 (Rovere et al., 1996), possibly the release of catecholamines during exercise may withdraw the membership of CD73/ecto-5'-NT to its receptor promoting its increase after exercise and thereby hinder their migration to the site of inflammation. One of the limitations of our study is that we did not perform flow cytometry analysis at all-time points. Thus, we do not know if there is a decrease in CD73 expression associated to the lymphopenia 1 hour of the exercise session.

On the other hand, positive cells for CD90/Thy-1 which is also expressed in mesenchymal and hematopoietic stem cells, and T lymphocytes (Cerasoli et al., 2001) decreased in a long-term pattern after running effort. It is well described that the catecholamines secretion during exercise may influence the immune system in several ways, such as lymphocyte proliferation (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000). Catecholamines increase exponentially with exercise intensity, reaching peak values above 90% of maximum heart rate (Kjaer et al., 1987). In vitro, it was shown that catecholamines downregulate the expression of Thy-1 (Wajeman-Chao et al., 1998; Lajevic et al., 2010). Wajeman-Chao et al.

(1998) demonstrated that catecholamines were immunosuppressive through cAMP-dependent pathways, leading to destabilization of Thy-1 mRNA post-transcription. This could explain the reduction in the expression of Thy-1 within 24 h after exercise.

Our study strengthens the evidence of an “open window” which is characterized as a transient immunosuppression after acute high intense exercise, increasing the susceptibility to infection (Kakanis et al., 2010). Here we used recreational subjects enrolled into a very popular 40 km relay race (each subject ran 4 km) in Brazil. Indeed, the number of recreational runners is remarkably increasing which makes the results obtained herein more important. The fact that the immune system is suppressed after exercise demands the requirement of recovery strategies that could minimize the susceptibility to infections, e.g. carbohydrate and glutamine supplementation, optimal exercise volume v.s. intensity and sufficient recovery between exercise stimuli (Li & Gleeson, 2005; Neto et al., 2011; Walsh et al., 2011; Goncalves et al., 2012).

In summary, high intensity running induced the classical immunosuppression in response to high intense exercise, and increased the number of CD73 and decreased CD90 cells. To our knowledge, this is the first study to investigate the expression of these molecules after exercise.

### ***Acknowledgements***

We are grateful to Professor Mário Vaisman from Federal University of Rio de Janeiro for the support with the muscle damage markers determination.

### ***Conflicts of interest***

All the authors approved the manuscript and state there is no conflict of interest.

### ***Financial Support***

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

## **REFERENCES**

- Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ & Jalkanen S. (1995). CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* 182, 1603-1608.
- Airas L, Niemela J & Jalkanen S. (2000). CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *J Immunol* 165, 5411-5417.
- Airas L, Niemela J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ & Jalkanen S. (1997). Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells. *J Cell Biol* 136, 421-431.
- Arvilommi AM, Salmi M, Airas L, Kalimo K & Jalkanen S. (1997). CD73 mediates lymphocyte binding to vascular endothelium in inflamed human skin. *Eur J Immunol* 27, 248-254.
- Brancaccio P, Maffulli N, Buonauro R & Limongelli FM. (2008). Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med* 27, 1-18, vii.
- Cerasoli DM, Kelsoe G & Sarzotti M. (2001). CD4+Thy1- thymocytes with a Th-type 2 cytokine response. *Int Immunol* 13, 75-83.

- Cunha FA, Midgley AW, Monteiro WD & Farinatti PT. (2010). Influence of cardiopulmonary exercise testing protocol and resting VO(2) assessment on %HR(max), %HRR, %VO(2max) and %VO(2)R relationships. *Int J Sports Med* 31, 319-326.
- Goebel MU & Mills PJ. (2000). Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med* 62, 664-670.
- Goncalves LC, Bessa A, Freitas-Dias R, Luzes R, Werneck-de-Castro JP, Bassini A & Cameron LC. (2012). A sportomics strategy to analyze the ability of arginine to modulate both ammonia and lymphocyte levels in blood after high-intensity exercise. *J Int Soc Sports Nutr* 9, 30.
- Herold MJ, McPherson KG & Reichardt HM. (2006). Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63, 60-72.
- Kakanis MW, Peake J, Brenu EW, Simmonds M, Gray B, Hooper SL & Marshall-Gradisnik SM. (2010). The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes. *Exercise immunology review* 16, 119-137.
- Kjaer M, Secher NH & Galbo H. (1987). Physical stress and catecholamine release. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1, 279-298.
- Krause R, Patruta S, Daxbock F, Fladerer P, Biegelmayr C & Wenisch C. (2001). Effect of vitamin C on neutrophil function after high-intensity exercise. *Eur J Clin Invest* 31, 258-263.
- Kruger K, Agnischock S, Lechtermann A, Tiwari S, Mishra M, Pilat C, Wagner A, Tweddell C, Gramlich I & Mooren FC. (2011). Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. *J Appl Physiol* 110, 1226-1232.
- Lajevic MD, Koduvayur SP, Caffrey V, Cohen RL & Chambers DA. (2010). Thy-1 mRNA destabilization by norepinephrine a 3' UTR cAMP responsive decay element and involves RNA binding proteins. *Brain Behav Immun*.
- Lancaster GI, Khan Q, Drysdale PT, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT & Gleeson M. (2005). Effect of prolonged exercise and carbohydrate ingestion on type 1 and type 2 T lymphocyte distribution and intracellular cytokine production in humans. *J Appl Physiol* 98, 565-571.
- Lee SH, Mizutani N, Mizutani M, Luo Y, Zhou H, Kaplan C, Kim SW, Xiang R & Reisfeld RA. (2006). Endoglin (CD105) is a target for an oral DNA vaccine against breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 55, 1565-1574.
- Li TL & Gleeson M. (2005). The effects of carbohydrate supplementation during repeated bouts of prolonged exercise on saliva flow rate and immunoglobulin A. *Journal of sports sciences* 23, 713-722.
- Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V & Chuturgoon A. (1998). High intensity exercise: a cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* 249, 366-370.
- Matthews CE, Heil DP, Freedson PS & Pastides H. (1999). Classification of cardiorespiratory fitness without exercise testing. *Med Sci Sports Exerc* 31, 486-493.
- Mooren FC, Blomling D, Lechtermann A, Lerch MM & Volker K. (2002). Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol* 93, 147-153.
- Neto JC, Lira FS, de Mello MT & Santos RV. (2011). Importance of exercise immunology in health promotion. *Amino acids* 41, 1165-1172.
- Neto RA, de Souza Dos Santos MC, Rangel IF, Ribeiro MB, Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Ferreira AC, Cameron LC, Carvalho DP & Werneck de Castro JP. (2013). Decreased Serum T3 after an Exercise Session is Independent of Glucocorticoid Peak. *Horm Metab Res*.



- Pedersen BK & Hoffman-Goetz L. (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 80, 1055-1081.
- Peters EM, Van Eden M, Tyler N, Ramautar A & Chuturgoon AA. (2006). Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. *Eur J Appl Physiol* 98, 124-131.
- Rege TA & Hagood JS. (2006). Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 1763, 991-999.
- Rovere P, Inverardi L, Bender JR & Pardi R. (1996). Feedback modulation of ligand-engaged alpha L/beta 2 leukocyte integrin (LFA-1) by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Immunol* 156, 2273-2279.
- Schmidt-Weber CB, Letarte M, Kunzmann S, Ruckert B, Bernabeu C & Blaser K. (2005). TGF- $\beta$  signaling of human T cells is modulated by the ancillary TGF- $\beta$  receptor endoglin. *Int Immunol* 17, 921-930.
- Starkie RL, Rolland J & Febbraio MA. (2001). Effect of adrenergic blockade on lymphocyte cytokine production at rest and during exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1233-1240.
- Thompson LF, Ruedi JM, Glass A, Low MG & Lucas AH. (1989). Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. *J Immunol* 143, 1815-1821.
- Thompson LF, Ruedi JM, Low MG & Clement LT. (1987). Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies. *J Immunol* 139, 4042-4048.
- van Eeden SF, Granton J, Hards JM, Moore B & Hogg JC. (1999). Expression of the cell adhesion molecules on leukocytes that demarginate during acute maximal exercise. *J Appl Physiol* 86, 970-976.
- Wajeman-Chao SA, Lancaster SA, Graf LH, Jr. & Chambers DA. (1998). Mechanism of catecholamine-mediated destabilization of messenger RNA encoding Thy-1 protein in T-lineage cells. *J Immunol* 161, 4825-4833.
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleschner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A & Simon P. (2011). Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exercise immunology review* 17, 6-63.
- Wolach B, Falk B, Gavrieli R, Kodesh E & Eliakim A. (2000). Neutrophil function response to aerobic and anaerobic exercise in female judoka and untrained subjects. *Br J Sports Med* 34, 23-28.
- Yu DT, Clements PJ & Pearson CM. (1977). Effect of corticosteroids on exercise-induced lymphocytosis. *Clin Exp Immunol* 28, 326-331.