

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LÁZARO ALESSANDRO SOARES NUNES

**“ESTUDO DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM PESSOAS FISICAMENTE
ATIVAS”**

Tese de mestrado apresentada ao
Instituto de Biologia para obtenção
do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de
Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

N922e

Nunes, Lázaro Alessandro Soares

Estudo de parâmetros hematológicos em pessoas fisicamente ativas / Lázaro Alessandro Soares Nunes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Contagem de células sanguíneas. 2. Treinamento. 3. Aptidão física. 4. Punção digital. I. Macedo, Denise Vaz de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Study of the hematological parameters in a active population.

Palavras-chave em inglês: Blood cell count; Training; Physical fitness; Digital puncture.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Denise Vaz de Macedo, Maria de Fátima Sonati, Eneida de Paula.

Data da defesa: 20/07/2006.

Agradecimentos:

À minha esposa Raquel, pelo apoio e paciência nos momentos difíceis desta caminhada.

À minha Orientadora Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, por acreditar no meu potencial e dividir comigo seu amplo conhecimento.

Aos meus amados pais, José e Militana, responsáveis pela edificação dos meus alicerces.

À Marcos e Patrícia responsáveis pela alegria de me conceder sobrinhos maravilhosos e a felicidade de tê-los como irmãos.

À minha família de maneira geral, não quero esquecer ninguém aqui, todos vocês são muito importantes para mim.

Ao meu amigo Fernando Catanho, que desde o primeiro dia no Labex me recebeu como um irmão.

Aos meus companheiros: Paulo, Rodrigo Hohl, Lucas, Madla, Clodoaldo, Renato, Danilo, Thiago, Duda, Mirtes, Fernanda, Professor Armindo, enfim, todos no Labex são muito importantes para mim.

À Ana Porto, por sua eficiência, dedicação e amizade.

Ao Dr. Marcelo da Silva Sechinato, pela constante troca de conhecimentos.

Aos proprietários e funcionários do Labclin e Drogaria Tiengo, em especial ao Marcos e Angelina Tiengo pela ajuda e compreensão no começo dessa caminhada.

À Luciana minha professora de Inglês, pelos momentos de aprendizagem.

À Andréia e Marina, por me atenderem sempre com muita eficiência.

À Deus, por ter colocado tantas pessoas boas no meu caminho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUÇÃO.....	1
Adaptação positiva ao treinamento físico: Equilíbrio entre estímulo vs. período regenerativo.....	3
<i>Overtraining</i> : Desequilíbrio entre estímulo vs. período regenerativo.....	4
Causas do <i>Overtraining</i>	5
Sobrecarga muscular e Inflamação.....	7
Coleta de sangue por punção venosa vs. punção digital.....	9
Limiar de Estresse.....	10
OBJETIVOS.....	12
JUSTIFICATIVA.....	13
ARTIGO 1 – Perfil hematológico de jovens submetidos a três meses de treinamento de endurance: um estudo longitudinal.	
<i>Hematological profile of young subjects submitted to three months of endurance training: a longitudinal study.....</i>	<i>15</i>
ARTIGO 2 - Adequacies of skin puncture for evaluating biochemical and hematological blood parameters in athletes.....	32
CONCLUSÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS.....	55

ABREVIATURAS

ATP: Adenosina trifosfato

CK: Creatina quinase

CO₂ : Dióxido de carbono

EDTA/K₃ : Ácido etileno diamino tetracético tripotássico

rhEPO: Eritropoetina recombinante

VCM: Volume corpuscular médio

HCM: Hemoglobina corpuscular média

CHCM: Concentração hemoglobínica corpuscular média

MXD: Soma de monócitos, basófilos e eosinófilos

RDW: Largura da curva de distribuição eritrocitária

WBC: Contagem total de Leucócitos

PLT: Contagem de plaquetas

2,3-BPG: 2,3-bisfosfoglicerato

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

Hct: Hematócrito

Hb: Hemoglobina

RBC: Contagem de hemácias

IFCC: Federação Internacional de Química Clínica

C0: Início do treinamento

C1: 1 mês após o início

C2: 2 meses após o início

C3: 3 meses após o início

C4: Após o teste de aptidão física

NT: Número total de sujeitos sem remoção de *outliers*

NR: Número total de sujeitos após remoção dos *outliers*.

IC: Intervalo de confiança

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram: i) estabelecer intervalos de referência para parâmetros hematológicos em uma população fisicamente ativa (3 h de atividade diária). Um sub-grupo de sujeitos dessa população, submetidos a um treinamento com características aeróbicas foi monitorado mensalmente nesses parâmetros hematológicos. O treinamento de três meses foi planejado objetivando a realização de um teste de aptidão física com índice eliminatório; ii) comparar parâmetros hematológicos e bioquímicos em amostras de sangue coletadas por punção digital e punção venosa em um grupo de atletas. Participaram do primeiro estudo 182 jovens do sexo masculino (17-19 anos), no primeiro estágio de preparação escolar e física para a carreira militar do Exército. Participaram do segundo estudo 21 atletas de modalidades diferentes (handebol feminino e futsal masculino). Os resultados apresentados no primeiro estudo mostraram que os intervalos de referência foram ligeiramente diferentes dos relatados na literatura, com faixas mais estreitas e valores superiores mais altos. Os resultados mostraram também uma melhora significativa no eritrograma já no primeiro mês de treinamento, com manutenção de valores mais altos nos meses subseqüentes. Os leucócitos elevaram-se na primeira e segunda coletas, embora dentro dos intervalos de referência estabelecidos, retornando para valores próximos ao basal no último mês de treinamento. A comparação de parâmetros bioquímicos e hematológicos por punção venosa e punção digital, apresentada no segundo estudo, mostrou que embora tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas em alguns parâmetros, os valores de todos os parâmetros analisados apresentaram alta correlação entre as duas formas de coleta, se situando dentro da faixa de referência. Esses dados confirmam que a punção digital pode ser utilizada em substituição à punção venosa, desde que todas as amostras sejam provenientes de um único tipo de coleta ao longo dos estudos, principalmente os longitudinais.

Palavras-Chave: hemograma, treinamento, endurance, pessoas fisicamente ativas, microcoleta, punção digital.

ABSTRACT

The present study was designed: i) to establish reference intervals for different hematological parameters in a physically active population (3 h activity/day) and to follow, monthly, the effect of a training with aerobic characteristics, looking forward the design of a eliminatory physical test, in a sub-group of this population; ii) to compare biochemical and hematological parameters, in blood collected from skin puncture and venous puncture in a group of athletes. One Hundred and eighty two young male (17-19 years), in the first period of training to enter The Army career, have participated in the first study. Twenty one athletes of different modalities (female handball and male futsal) had participated in the second study. The results presented in the first study showed reference intervals slightly different from those in the literature, with narrower intervals and higher maximum values. The results had also shown a significant increase in the number of the red blood cells in the first month of training, with high values maintained in the subsequent months. The leukocytes had raised in the first and the second collections, inside the established intervals of reference, returning to basal values in the last month of training. The comparison of biochemical and hematological parameters for venous and digital puncture presented in the second study, exhibited significant difference in some parameters, although a high degree of correlation was observed between the two techniques for all parameters, which had within the normal expected range. These data confirm that skin puncture can be used in place of venous punction, as far as blood collection were conducted in the same way along the study, mainly in the longitudinal ones. For being a less invasive technique, digital punction facilitates the longitudinal study in sport teams through these hematological and biochemical analyses.

Key-words: Hemogram, training, endurance, digital puncture, physical activity practitioners

INTRODUÇÃO

O sangue é um tecido de transporte e perfaz cerca de 5% do peso corporal humano, ele é uma suspensão de células, dispersas em um meio aquoso complexo chamado plasma (El-Sayed et al., 2005). O plasma é a fase líquida do sangue e contém moléculas orgânicas de extrema importância para o funcionamento do organismo, como por exemplo as proteínas albumina, transferrina e globulinas, os eletrólitos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-), além de glicose, principal combustível do cérebro e das hemácias. A centrifugação de uma amostra de sangue permite separar os seguintes constituintes celulares do plasma: hemácias, leucócitos e plaquetas.

As hemácias ou eritrócitos são as células mais numerosas do sangue, ocupando cerca de 48% do seu volume total em homens adultos (Perutz, 1978). Embora seja uma célula anucleada e desprovida de mitocôndrias, seu citoplasma possui todo o aparato enzimático para a produção da energia necessária para assegurar a integridade da membrana celular, manter as concentrações iônicas (interna e externas), converter CO_2 em íon bicarbonato (a principal via de transporte de CO_2 dos tecidos para os pulmões), além de prevenir a oxidação da hemoglobina impedindo que se converta em sua forma não funcional, a metahemoglobina (Telen, 1998).

O principal componente protéico das hemácias é a hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos. O O_2 se liga reversivelmente à hemoglobina nos alvéolos pulmonares, e é liberado nos tecidos em função da saturação mais baixa de O_2 . A curva de dissociação da hemoglobina de um indivíduo normal apresenta uma forma sigmóide característica (Telen, 1998). Vários são os fatores que influenciam no deslocamento desta curva por alterar a afinidade entre a hemoglobina e o oxigênio, facilitando a liberação de O_2 para os tecidos. Entre eles estão a própria pressão parcial de O_2 (pO_2) tecidual, pH e concentração de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), seu principal modulador alostérico negativo (Benesch & Benesch, 1967).

O O_2 absorvido pelo sangue que passa pelos capilares alveolares é continuamente trazido do meio externo para os alvéolos. Quanto mais rapidamente o oxigênio for absorvido,

tanto menor será sua concentração nos alvéolos; por outro lado, quanto mais rapidamente o novo oxigênio é trazido da atmosfera para os alvéolos, tanto maior é a sua concentração. Portanto, nos alvéolos, a pO_2 é controlada pela velocidade com que o oxigênio atmosférico entra nos pulmões, graças ao processo da ventilação, e pela velocidade com que o oxigênio é absorvido pelo sangue ligando-se à hemoglobina (Telen, 1998).

Os leucócitos, como parte não-específica do sistema imune, são os primeiros a responder à lesão tecidual. Os leucócitos que atuam no sítio da inflamação são de dois tipos: neutrófilos polimorfonucleares e células mononucleares (Smith, 2000). Os neutrófilos são a primeira sub-população de leucócitos a aparecer no sítio lesionado (Pizza et al., 2002). Eles são produzidos na medula óssea, e representam cerca de 50 a 60% do total de leucócitos circulantes no sangue (Toumi & Best, 2003). A função predominante dos neutrófilos é a remoção dos elementos indesejáveis relacionados à lesão tecidual por fagocitose (Smith, 2000). Para isso, os neutrófilos ativados liberam proteases lisossomais que degradam as proteínas locais, além de formar espécies reativas de oxigênio (EROs) como resultado do *burst* respiratório (Pyne, 1994).

Os monócitos formam a segunda sub-população de leucócitos a aparecer no local lesionado. Quando essas células se movem da circulação para os tecidos são diferenciados em macrófagos (Tidball, 1995). Durante o período de recuperação de um exercício, as contagens de leucócitos voltam para níveis normais dentro de 12 a 48 horas (Gleeson, 1995; Suzuki et al, 1999). Se a contagem de leucócitos permanecer elevada após o período de repouso pós-exercício intenso, é sinal de que o processo inflamatório pode tornar-se sistêmico ou crônico (Pyne, 1994).

As plaquetas desempenham importante função no controle do sangramento e na gênese do trombo (Marcus & Zucker, 1965), elas geralmente se elevam durante a realização de uma atividade física (Fallon et al. 1999) e não se mostram alteradas durante uma temporada competitiva (Banfi et al. 2006).

Adaptação positiva ao treinamento físico: Equilíbrio entre estímulo vs. período regenerativo.

A modulação da intensidade, duração e frequência de esforço físico durante as sessões de treino têm o objetivo de aumentar o rendimento em capacidades motoras diversas, que diferem em ordem de prioridade, dependendo da especificidade do trabalho muscular realizado (Bompa, 2001). O princípio da sobrecarga é um dos princípios do treinamento necessários para a adaptação do organismo. Do ponto de vista metabólico e fisiológico, sobrecarga significa que o exercício realizado deve constituir-se num estímulo estressor suficiente para provocar distúrbios agudos relacionados à fadiga nas células, órgãos e estruturas envolvidas com o movimento.

A resposta do organismo a esse estresse é imediata, e envolve ações integradas entre cérebro, glândulas, hormônios, sistema imune, coração, musculatura esquelética, sangue e pulmões, permitindo a adequação no fornecimento de combustível, oxigênio e energia, aumentos na força e resistência muscular, resistência à dor, acuidade mental, além de uma proteção temporária contra infecções. Ou seja, causar doença ou algum tipo de dano não é a função da resposta a nenhum tipo de estresse. Representa sim, um mecanismo evolutivo conservado, pelo qual as células se defendem contra mudanças abruptas e adversas do meio ambiente, se adaptando positivamente a elas (Welch, 1993).

É preciso deixar claro, no entanto, que as respostas adaptativas positivas que esperamos que aconteçam nessas estruturas e que envolvem a instalação de um processo inflamatório (responsável pelo reparo e regeneração dos tecidos lesionados), aumento na concentração de reservas intramusculares de ATP, aumento na atividade de enzimas-chave do metabolismo e síntese de novas proteínas, acontecem durante o período de descanso. Dessa forma, se o período de recuperação for adequado em relação às cargas de esforço aplicadas, os níveis de atividade enzimática e de substratos metabólicos podem ser restabelecidos acima daqueles detectados antes do treinamento e as fibras musculares se regeneram plenamente dos traumas sofridos. Esse processo é conhecido na literatura como *supercompensação*, e propicia melhor

suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia em atividades físicas que eram habituais na estrutura do treinamento (Fry et al., 1992; Bruin et al., 1994).

Resumindo, a aplicação do princípio da sobrecarga induz uma fadiga reversível (*fadiga aguda de treinamento*) e a *supercompensação* ocorre após alguns dias, ou de um período de carga de treinamento reduzida, ou de descanso (também chamado de micro-ciclo regenerativo).

Overtraining: Desequilíbrio entre estímulo vs. período regenerativo.

Overtraining é um termo geral, que indica um desequilíbrio constante entre cargas de esforço físico e período regenerativo, no sentido de aumentos no primeiro. Isso resulta num estado crônico de fadiga associado à perda de performance, mesmo após um período maior de recuperação (Stone et al., 1991; Kuipers & Keizer, 1998; Platen, 2002). A literatura denomina o *overtraining* de curta-duração de *overreaching*. Nesse sentido, alguns pesquisadores consideram o *overreaching* como parte do estímulo e adaptação ao treinamento (Fry et al., 1997; Stone et al., 1991). Os sintomas do *overreaching* podem ser revertidos por um período regenerativo mais longo que o normal (Fry et al., 1992; Kuipers, 1998; Petibois et al., 2003).

No entanto, se a recuperação ou a carga de treinamento continuarem inadequadas, o *overreaching* pode progredir para o *overtraining* (Kuipers & Keizer, 1988; Lehmann et al, 1993), pois a transição entre fadiga aguda de treinamento, *overreaching* e *overtraining* é bastante tênue. Assim, qualquer descuido pode levar à instalação da síndrome do *overtraining*, caracterizada por um estado de fadiga severa, prolongada, com diminuição na performance, independente da manutenção ou diminuição da carga de esforço físico realizada. Esses sintomas podem estar ou não associados a um estado catabólico acentuado, a instalação de um processo inflamatório sistêmico, a alterações fisiológicas, imunológicas e bioquímicas; ao aumento na susceptibilidade a lesões e alterações no processamento de informações psicológicas (Fry et al., 1992; Tiidus, 1998; Lehmann et al., 1998). Ou seja, os sintomas do *overtraining* podem ser muito variados, mas uma

vez a síndrome instalada, sua recuperação completa é bastante lenta, e a única forma de tratamento é o repouso (Smith, 2000; Petibois et al., 2003).

Um dos maiores problemas dos técnicos e preparadores físicos é que muitas vezes, na prática, a queda no rendimento nessa situação é confundida com falta de estímulo, e não com excesso. Essa interpretação equivocada normalmente leva a comissão técnica a aumentar ainda mais a carga de esforço, com diminuição do período regenerativo. Isso pode exceder o limite individual de estresse que o organismo pode suportar, contribuindo para o aumento na susceptibilidade a lesões em decorrência do *overtraining* (Smolka et al., 2000; Zoppi et al., 2003). Não podemos esquecer que o atleta lesionado também tem que parar suas atividades, sendo que a recuperação das lesões, dependendo do seu grau, muitas vezes também pode ser muito demorada.

Uma maneira interessante de atuar na prevenção desses estados seria poder utilizar biomarcadores moleculares para detectar a instalação do *overtraining* e, desta forma, modular menos empiricamente as razões volume/intensidade, estímulo/descanso aplicadas durante o treinamento. Porém, a complexidade em se estabelecer um determinado marcador, ou um grupo de marcadores para diagnosticar *overtraining* está no fato de atletas nessa situação não necessariamente apresentarem as mesmas respostas fisiológicas. A única alteração apresentada por todos os atletas parece ser a perda da capacidade de rendimento (Rowbottom et al., 1998). Mesmo assim, nem todas as capacidades biomotoras são diminuídas simultaneamente, ou sofrem o mesmo grau de impacto, dificultando ainda mais a predição desse estado (Smith, 2000).

Causas do *Overtraining*

Embora as consequências do *overtraining* estejam bem caracterizadas (Fry et al, 1991), suas causas ainda estão sendo investigadas. Há proposições que o alto grau de fadiga que caracteriza o *overtraining* pode ser decorrente de uma proteólise acentuada, que aconteceria principalmente em situações de reposição parcial das reservas de glicogênio muscular pós-exercícios ou jogos (Costill et al., 1988). Dohm e colaboradores (Dohm et al., 1982) mostraram

correlação positiva entre valores plasmáticos de uréia elevados e traumas na musculatura (gerados através dos próprios estímulos de treino), representados pelo aumento na atividade da enzima creatina quinase (CK) no plasma. No entanto, existem estudos que já reportaram atletas numa situação de *overtraining* com os depósitos de glicogênio repletos (Snyder, 1998).

Uma hipótese bem aceita, até por possuir uma quantidade maior de investigações e conseqüentemente mais evidências experimentais aponta para o papel do hipotálamo e ativação do sistema nervoso autônomo (Lehmann et al., 1998), com o envolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas. Esta hipótese explica, através de alterações nas secreções de catecolaminas, glicocorticóides e testosterona, grande parte das alterações já evidenciadas pela literatura em resposta ao *overtraining* (Fry & Kramer, 1997).

A teoria da glutamina proposta por Newsholme (1991), é decorrente de uma série de observações que mostraram queda nas concentrações plasmáticas deste aminoácido em indivíduos overtreinados (Keast, 1996). Nesse sentido, Rowbottom e colaboradores (Rowbottom et al., 1995) analisaram 10 atletas overtreinados de várias modalidades através de vários parâmetros bioquímicos, fisiológicos e imunológicos, e mostraram que a glutamina foi o único parâmetro que diminuiu consistentemente em todos os indivíduos. Essa teoria propõe que o estresse excessivo ocasionado pelo desequilíbrio treino/recuperação seria responsável pela queda deste aminoácido no plasma, levando à supressão do sistema imune, pois a glutamina é essencial para a proliferação de linfócitos e a função de macrófagos.

Uma hipótese mais recente, que tenta integrar todas as apresentadas acima propõe que o iniciador do *overtraining* seria uma progressão do estágio benigno dos micro-traumas adaptativos na musculatura esquelética e articulações para um estágio de dano sub-clínico no atleta submetido a treinos intensos e com pouco tempo de recuperação; ou, numa circunstância de reinício de treinamento antes da recuperação total de um dano agudo, o que poderia exacerbar o dano inicial (Smith, 2000; Smith, 2004). Segundo essa proposta, a inflamação aguda local em resposta aos traumas se tornaria crônica, e as citocinas liberadas durante esse processo

ativariam monócitos circulantes a produzir mais citocinas pró-inflamatórias, que resultariam num processo inflamatório sistêmico, o desencadeador do *overtraining*. Dados da literatura mostraram que o processo inflamatório pode ser desencadeado por estresse mecânico, isquemia local e geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) na musculatura esquelética, principalmente após exercício de alta intensidade (Venkatraman et al., 2000). No entanto, é importante ressaltar que a magnitude da resposta inflamatória depende do tipo, duração e intensidade do exercício físico empregado (Malm, 2001; King et al., 2003).

Postula-se também que a elevação na produção de EROs, que acompanha o aumento da atividade contrátil muscular (Davies et al., 1982; Alessio, 1993) parece ser importante tanto para a adaptação positiva (Smolka et al., 2000) quanto para a propagação do dano muscular induzido pelo exercício e a resposta inflamatória subsequente (Tiidus, 1998). Recentemente, foi proposto que o estado redox citosólico poderia ser uma variável regulada fisiologicamente, balanceada pela produção de oxidantes e capacidade de tamponamento antioxidante, predizendo que existiria um estado redox intracelular que é ótimo para a geração de força (Reid, 2001).

Sobrecarga muscular e Inflamação

Evidências experimentais mostraram que em resposta às lesões teciduais induzidas pelo exercício instala-se um processo inflamatório agudo, que ao seu final tem a função de promover a regeneração do tecido normal. A resposta inflamatória é um mecanismo muito bem elaborado e sincronizado, com grande capacidade de amplificação em cada passo, visando o movimento de fluídos, proteínas plasmáticas e de leucócitos da circulação para o local lesionado (diapedese) e ativação das células do sistema imunitário (Tidball, 1995; Smith, 2000; Curi et al., 2002). Para isso, ocorre vasodilatação arteriolar periférica e aumento da permeabilidade vascular. A migração de leucócitos (neutrófilos e monócitos ativados) para o local da inflamação induz acúmulo de plasma no espaço intersticial, desencadeando o edema (Calich & Vaz, 2001).

Um grupo de moléculas, coletivamente conhecidas como citocinas são as responsáveis pela coordenação local e sistêmica dos vários tipos celulares envolvidos na inflamação, tais como

leucócitos, células progenitoras, células endoteliais e os hepatócitos. As citocinas podem ter atividade pró-inflamatória ou antiinflamatória e estão envolvidas na amplificação de várias vias do processo inflamatório (Smith, 2000). Uma dessas ações envolve a síntese hepática de proteínas de fase aguda, tais como: alfa-1-glicoproteína ácida, proteína C-reativa e proteína amilóide sérica A (Baumann & Gaudie, 1994; Fallon et. al., 2001; Geffken et. al., 2001; Ridker et. al., 2001). A síntese dessas proteínas representa um aspecto crucial da resposta imune/inflamatória, pois são elas que ajudam a conter a amplificação potencialmente letal da inflamação. Atuam no reparo tecidual e servem como agentes protetores do dano excessivo resultante do evento inflamatório ocasionado pelas enzimas catabólicas e EROs liberadas pelas células fagocitárias (Fleck et al., 1983; Macintyre, 1988; Baumann & Gaudie, 1994; Koj & Guzdek, 1995). Existem ainda as proteínas classificadas como proteínas de fase aguda negativa dentre elas estão: albumina, transferrina, apolipoproteína A1 e alfafetoproteína), que tem sua síntese diminuída durante a resposta de fase aguda (Kushner & Rzewnicki, 1994).

As proteínas de fase aguda podem aumentar em diferentes magnitudes, ou seja, a proteína C-reativa e a amilóide sérica A podem se elevar até 1000 vezes, dependendo da magnitude do estímulo inflamatório (Kushner, 1994; Black et al., 2004; Jensen & Whitehead, 1998), já a alfa-1-glicoproteína ácida apresenta aumentos discretos de 2 a 4 vezes o valor inicial (Jensen & Whitehead, 1998). A principal função da proteína C-reativa está provavelmente relacionada ao reconhecimento e ligação de patógenos e constituintes de células danificadas na inflamação (Black et al., 2004). A literatura mostra efeitos variados de proteínas de fase aguda após a realização de exercício físico, porém estas alterações ainda não estão bem caracterizadas para os diferentes modelos de exercício, sendo necessário estudos adicionais sobre o impacto dos exercícios nessas proteínas (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Coleta de sangue por punção venosa vs. punção digital

Parece claro que a análise de alguns destes parâmetros bioquímicos e hematológicos pode ser uma ferramenta útil na avaliação de atletas e prevenção de lesões oriundas da prática esportiva (Lac & Maso, 2004). Para isso, a punção venosa tem sido a metodologia mais comumente utilizada para a coleta de sangue. Porém, para muitos indivíduos ela é geralmente traumática e incômoda, gerando um grau de estresse elevado (Lavery & Ingram, 2005). Na prática clínica em geral, a necessidade de uma forma de coleta alternativa, menos traumática e menos invasiva algumas vezes se faz necessária, pela dificuldade inerente à patologia de base do indivíduo. Assim, o uso de soro ou plasma de outro tipo de punção tal como a punção digital ou no lóbulo da orelha são de importância relevante para crianças, pacientes queimados, obesos, pacientes com câncer, idosos e situações onde se fazem necessárias várias coletas em sequência (Falch, 1981; Blumenfeld et al., 1977).

Nossa experiência trabalhando com atletas mostra que um dos maiores problemas para a realização de coletas sanguíneas mensais, que permitiriam o monitoramento do ano competitivo é a coleta de sangue por punção venosa, pois a maioria das análises necessitam ser realizadas em campo por um profissional treinado e habilitado, impossibilitando assim os preparadores físicos de realizar tal procedimento. Dessa forma, a análise do sangue de atletas em treinamento ou durante a realização de uma competição poderia ser enquadrada nas situações citadas anteriormente, onde uma forma alternativa de coleta poderia solucionar o problema.

O sangue obtido pela punção digital, no entanto, é uma mistura de sangue de arteríolas, vênulas, capilares, fluído intersticial e provavelmente fluído intracelular. (Falch, 1981; Blumenfeld et al., 1977). Dessa forma, para alguns constituintes sanguíneos pode haver diferença entre o sangue coletado por punção venosa e punção digital.

Poucos estudos comparam o sangue obtido através de punção digital e venosa. Dentre eles, Falch (1981) observou que as dosagens de uréia, bilirrubina, aspartato amino transferase, alanina amino transferase e lactato desidrogenase não apresentavam qualquer diferença entre as

amostras provenientes de ambos os tipos de punção. Kupke et al., (1981) também não encontrou nenhuma diferença entre as concentrações de potássio, fósforo e glicose. Jedeikin et al., (1982) realizou dosagens da enzima creatina quinase (CK) e suas isoenzimas em sangue de cordão umbilical e punção digital de recém-nascidos, encontrando resultados satisfatórios.

As análises hematológicas também têm se mostrado viáveis para este tipo de coleta. Nos estudos de Daae et al. (1988), parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina e contagem de hemácias não apresentaram diferença estatística. O número de leucócitos ficou um pouco acima na punção digital (8,17%), resultados confirmados por Yang e cols (2001). As diferenças encontradas nestes estudos, muitas vezes são estatisticamente importantes, porém nem sempre são clinicamente significantes, justificando o seu uso na prática clínica. Vale ainda ressaltar que os sujeitos utilizados nos trabalhos citados eram na sua maioria pessoas sedentárias ou pacientes acometidos de alguma enfermidade. Estudos com exercício físico utilizando punção digital são raros, e muitas vezes se restringem a avaliar o efeito agudo do exercício (Godfrey et al., 2003).

Limiar de Estresse

Essa tese de mestrado faz parte de um projeto temático Pronex/Fapesp, coordenado pelo Prof. Dr. Lauro Kubota, do Laboratório de Eletroquímica, Eletroanalítica e Desenvolvimento de Sensores (LEEDS/IQ/Unicamp) e desenvolvido em parceria com pesquisadores do Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex, Depto Bioquímica/IB), coordenado pela Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, com a colaboração dos Profs. Dr. Armindo Antônio Alves e do Dr. José Camillo Novello, do Laboratório de Química de Proteínas (Depto Bioquímica/IB).

O projeto Pronex/Fapesp prevê o monitoramento simultâneo dos principais marcadores tanto de adaptação quanto de *overreaching/overtaining* já descritos na literatura, em atletas de diferentes modalidades e pessoas fisicamente ativas, e também em ratos submetidos a protocolos de treinamento de alta intensidade, com variação na frequência de recuperação ou

submetidos a exercícios exaustivos agudos. O objetivo do grupo é poder correlacionar as respostas obtidas nas diversas situações de exercício, a fim de discriminar os melhores marcadores de adaptação positiva e *overreaching/overtraining*, que passarão a compor a técnica Limiar de Estresse.

A idéia da técnica é poder modular a intensidade do treino, independentemente da metodologia de treinamento utilizada por cada comissão técnica, através da análise combinada das respostas de marcadores sangüíneos. Assim, somente aqueles atletas detectados no limiar de estresse seriam separados do restante do elenco e teriam suas sessões de treinos conduzidas individualmente, com cargas diferenciadas (reduzidas), até a normalização dos dados. Um dos obstáculos a transpor é o estabelecimento de intervalos de referência para grupos específicos de atletas e não atletas. Um significativo percentual de resultados de exames laboratoriais realizados em atletas situa-se fora dos valores de referência usuais recomendados para indivíduos não praticantes de atividade física regular. Assim, é necessário estabelecer intervalos de referência para uma população fisicamente ativa, a fim de verificar quais são os biomarcadores mais sensíveis ao treinamento físico, tanto no sentido de mostrar adaptação como mal-adaptação, em atletas e não atletas.

OBJETIVOS

Os objetivos da presente dissertação foram:

- ✓ Determinar valores de referência de algumas análises hematológicas, para um grupo de pessoas fisicamente ativas com faixa etária definida (17-19 anos), praticantes de atividade física diária periodizada.
- ✓ Avaliar mensalmente os efeitos de um treinamento periodizado de 3 meses em parâmetros hematológicos, a fim de determinar quais os mais sensíveis em apontar resposta adaptativa positiva ao exercício..
- ✓ Comparar alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos de amostras de sangue coletadas por punção digital e punção venosa em atletas de sexo e modalidades diferentes.

Essa dissertação foi dividida em 2 capítulos, cada um composto de um artigo. O artigo 1 apresenta valores de referência de parâmetros hematológicos para um grupo de pessoas fisicamente ativas, e o monitoramento desses parâmetros ao longo de quatro meses de treinamento que antecederam um teste de aptidão física realizado pelos cadetes como parte do processo de ingresso na carreira militar. O artigo 2 apresenta a comparação de parâmetros bioquímicos e hematológicos de amostras de sangue de atletas de uma equipe de handebol feminino e futsal masculino provenientes de punção digital e punção venosa, a fim de verificar se existem diferenças estatísticas ou clínicas nos valores encontrados.

JUSTIFICATIVA

Valores de referência populacionais devem ser obtidos de um grupo de indivíduos de referência bem definido (Horn & Pesce, 2003; Ritchie & Palomaki, 2004). Nesse sentido, os alunos da Escola Preparatória de Cadetes do Exército – EsPCEx de Campinas/SP podem ser considerados uma população de referência, pois: possuem uma faixa etária bem definida, originam-se de diferentes regiões do Brasil, com características predominantemente caucasóide, vivem sob as mesmas condições, possuem uma alimentação controlada e nutricionalmente adequada e praticam atividades físicas diárias e regulares (Ritchie & Palomaki, 2004).

CAPÍTULO 1

1º artigo (a ser submetido para a revista haematologica/the hematology journal, Fator de impacto:4,192, após ser transcrito para o inglês)

HEMATOLOGICAL PROFILE OF YOUNG SUBJECTS SUBMITTED TO THREE MONTHS OF ENDURANCE TRAINING: A LONGITUDINAL STUDY.

Lazaro Alessandro S. Nunes & Denise Vaz de Macedo*

Laboratório de Bioquímica do Exercício-LABEX, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Unicamp, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/nº, Barão Geraldo, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

* Corresponding author: phone 005519 3788 6145, fax 005519 3788 6129; e-mail: labex@unicamp.br.

RESUMO

O exercício físico pode promover alterações metabólicas significativas no volume plasmático, nas células vermelhas e leucócitos, que podem refletir tanto um melhor desempenho nas modalidades aeróbicas, como a instalação de processo inflamatório sistêmico, em função da mal-adaptação ao exercício. O objetivo deste estudo foi estabelecer intervalos de referência para parâmetros hematológicos em uma população fisicamente ativa (n=126) após 3 meses de treinamento com características aeróbicas (maior volume, menor intensidade). Monitoramos ainda um outro sub-grupo de 56 sujeitos, mensalmente, durante o período de treinamento e após a realização do teste de aptidão física, de caráter eliminatório. Participaram deste estudo 182 jovens do sexo masculino (17-19 anos), postulantes ao ingresso na carreira militar. Foram realizadas quatro coletas de sangue total em EDTAK₃ para a realização do hemograma. Os intervalos de referência mostraram-se ligeiramente diferentes dos relatados na literatura, com faixas mais estreitas e valores superiores mais altos. Os resultados apresentados mostraram aumento significativo na série vermelha já no primeiro mês de treinamento, com manutenção de valores mais elevados nos meses subseqüentes. Os leucócitos elevaram-se na primeira e segunda coletas, embora dentro dos intervalos de referência observados para essa população, retornando para valores próximos ao basal no último mês de treinamento. Os resultados obtidos sugerem que o treinamento aplicado induziu resposta adaptativa positiva nos indivíduos, conferindo melhor aporte de O₂ para a musculatura e maior resistência muscular.

Palavras-Chave: hemograma, treinamento, endurance, pessoas fisicamente ativas.

SUMMARY

An increase in the number of circulating erythrocytes and concentration of hemoglobin can reflect in better performance in the endurance sports. On the other hand, a reduction in these parameters can reduce the performance. Exercise can also promote significant metabolic alterations in the leukocytes, considered to be the non specific part of the immune system, since they are the first ones to answer to stress of the exercise. Thus, to differentiate the positive and negative adaptation condition it is important to know the minimum and maximum reference intervals for a well trained population. The objective of this study was to follow the hematological parameters of a physically active population during a period of four months of training with aerobic characteristics. One hundred and eighty two young men (17-19 years) under daily physical activity practition had participated of this study. For hematological determinations were collected in five periods 5,0mL of blood in EDTAK₃. The results had shown a significant imcrease in the red blood cells number in the first month of training, with maintenance of the high values in the subsequent months. Leukocytes were increased in the first and second collections, even inside of the intervals of minimum and maximum values observed in this population, returned to values next to the basal ones in the end of the last month of training. The results suggest that training induced a positive response in the individuals, with improvement in the gain of O₂ for the musculature and greater muscular resistance.

KEY WORDS: Blood count, training, endurance, exercise.

INTRODUÇÃO

Embora esteja bem documentado que o exercício físico promove alterações significativas nas hemácias, leucócitos, e também na viscosidade do sangue e plasma (Pedersen & Toft, 2000; Fallon, 2004, El-Sayed et al., 2005), uma das principais dificuldades para se interpretar dados do perfil hematológico em atletas é a falta de estudos sobre as respostas adaptativas ao exercício crônico, visto que a maior parte dos estudos disponíveis avalia o efeito agudo de sessões de exercício (Pedersen & Hoffman-Goetz, 2000).

Evidências experimentais indicam que a viscosidade do sangue e plasma aumenta em resposta a variados protocolos de exercício agudo, retornando para valores próximos dos normais em 24 h de repouso (Kargotich et al., 1998). Esse aumento na viscosidade normalmente é atribuído ao aumento do hematócrito, resultante da transferência de fluidos do sangue para o espaço intersticial, o que leva à hemoconcentração.

A maioria dos trabalhos da literatura relatam também uma leucocitose acentuada com o exercício agudo extenuante, principalmente de neutrófilos segmentados e linfócitos (Nieman et al., 1998; Ronsen et al., 2001; Pyne, 1994; Suzuki et al., 1999; Smith, 2000). A magnitude da leucocitose associada com o exercício parece depender mais da intensidade da atividade que da sua duração (Pizza et al., 2002). Geralmente os linfócitos circulantes voltam aos níveis normais após uma hora de repouso, sendo que os neutrófilos podem demorar até 12 horas (Suzuki et al., 1999). Os dados apresentados por Gleeson (1995), no entanto, mostraram valores de leucócitos diminuídos em até 15 - 20% dois e três dias após exercício excêntrico quando comparados aos valores pré-exercício, com um pico de elevação 4 horas pós-exercício.

Estudos longitudinais, embora menos numerosos, indicam que atletas de endurance apresentam hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb) e contagem de hemácias (RBC) reduzidos, quando comparados a indivíduos sedentários ou praticantes de treinamento de força (Schumacher et al., 2002a; Schumacher et al., 2002b; Fallon et al., 2002). Propõe-se que esse efeito seja devido principalmente à expansão do volume plasmático (Schumacher et al., 2002a),

que acaba mascarando o estímulo da eritropoiese induzida pelo exercício (Kargotich et al., 1998). A hipervolemia e efeito dilucional do sangue induzido pelo treinamento de endurance podem ser vantajosos para a dissipação de calor, maior débito cardíaco e menor número de batimentos/min durante o exercício. A diminuição na viscosidade do sangue também aumenta a microcirculação devido a uma menor resistência do fluxo sanguíneo, melhorando a liberação de O₂ na musculatura (El-Sayed et al., 2005).

Estudos relacionaram também a diminuição nos valores da série vermelha em atletas de endurance com a destruição (hemólise) ocasionada pelos traumatismos inerentes à modalidade, a chamada “anemia do esporte” (Schumacher et al., 2002a; Shaskey e Green, 2000). A frequência e severidade da hemólise foram positivamente correlacionadas com a quantidade de estresse mecânico imposta a corredores e praticantes de ginástica aeróbica (Shaskey & Green, 2000). No entanto, uma hemólise clinicamente significativa, que resulte em anemia é rara, e vista ocasionalmente em atletas de elite.

Estudos longitudinais, em sujeitos com diferentes históricos de treinamento são ainda mais escassos na literatura (El-Sayed et al., 2005). Uma das dificuldades de se avaliar os efeitos da progressão do treinamento aplicado através de parâmetros hematológicos é a falta de valores de referência mais adequados, obtidos de um grupo de indivíduos de referência bem definido (Horn & Pesce, 2003; Ritchie & Palomaki, 2004). A maioria dos valores de referência usados pelos laboratórios são sugeridos pelos fabricantes nas instruções dos kits, onde os dados da população original ou os testes estatísticos utilizados normalmente não estão disponibilizados. Além disso, existem as variações produzidas pela idade, raça, sexo, dieta, ritmo circadiano e exercício físico nas análises bioquímicas, que não são levadas em conta (Ritchie & Palomaki, 2004; Smith et al., 2004).

Os estudos que relacionam o efeito do treinamento físico nos valores de parâmetros hematológicos disponíveis na literatura são muito variados e não possibilitam o cálculo de um intervalo de referência confiável, pois muitas vezes o número de sujeitos utilizados no cálculo é

muito reduzido. Além disso, existe uma considerável diferença entre as populações exclusivamente européias e a população brasileira, isto torna pouco viável a utilização de estudos do tipo meta-análise para o cálculo de intervalos de referência.

Os equipamentos utilizados na realização dos exames que vão originar os valores de referência também podem produzir variações entre intervalos de referência para o mesmo analito, devido aos diferentes coeficientes de variação produzidos (Bossche, et al., 2002).

O objetivo deste estudo foi estabelecer valores de referência para parâmetros hematológicos em um grupo de sujeitos não atletas de faixa etária bem definida, representativo de diferentes regiões do País, que estudam e vivem sob as mesmas condições (n=126). Os sujeitos possuem alimentação controlada e nutricionalmente adequada e são praticantes de 3 horas de atividades físicas diárias e regulares. Monitoramos ainda através da análise dos mesmos parâmetros hematológicos um outro grupo de 56 sujeitos pertencentes a essa mesma população antes, durante três meses de treinamento periodizado com características aeróbicas (maior volume, menor intensidade), e após o teste de aptidão física com índice eliminatório.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos

Participaram deste estudo 182 voluntários do sexo masculino, [peso $74,3 \pm 9,5$ kg e altura 177 ± 6 cm e idade 18 ± 1 anos (média $\pm$ desvio padrão)], no primeiro estágio de preparação escolar e física para o ingresso na carreira militar do Exército. Todos os sujeitos voluntários tomaram conhecimento da pesquisa previamente, e assinaram um termo de Consentimento Pós-Informação. Os participantes responderam a um questionário informando uso de medicação, queixa de dor ou contusão ocasionada pelo treinamento. Os sujeitos que estavam fazendo uso de medicação foram excluídos da pesquisa. Os critérios de escolha da população para o estabelecimento dos intervalos de referência, bem como as recomendações para a coleta do material foram baseados nas recomendações aprovadas pela Federação Internacional de

Química Clínica – IFCC (Solberg, 1987). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com Humanos – Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/Unicamp (019/2004).

Cronograma das análises

Foram coletados 5,0 mL de sangue venoso total em EDTA/K₃ em tubos Vacuette no período da manhã (6:00 – 6:30 h), com os sujeitos em jejum de 8 horas. O hemograma foi realizado imediatamente após a coleta do sangue. Do total de 182 sujeitos, 126 foram utilizados para o cálculo dos intervalos de referência e 56 foram avaliados longitudinalmente através de cinco coletas de sangue (C₀ = início do treinamento, C₁ = após 1 mês, C₂ = após 2 meses, C₃ = após 3 meses, C₄ = após o teste de aptidão física). É importante ressaltar que o teste de aptidão física possuía caráter eliminatório em função do índice obtido. Todas as coletas de sangue foram realizadas após 2 dias sem qualquer atividade física para evitar efeitos de hemodiluições agudas induzidas pelo exercício (Schumacher et al.; 2002, Kargotich et al., 1998; Green et al., 1984).

Análises Sanguíneas

Todas as análises hematológicas foram realizadas no aparelho KX-21N Sysmex® e incluíram: contagem de hemácias (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM), largura da curva de distribuição eritrocitária (RDW), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem total de leucócitos (WBC), contagem de linfócitos, neutrófilos e soma de eosinófilos, basófilos e monócitos (MXD) e contagem de plaquetas (PLT).

Análises Estatísticas

O primeiro passo para a determinação de intervalos de referência é conhecer os dados da amostra. Para isso, foram feitos histogramas com a utilização do programa Microcal Origin 6.0. Após, os outliers foram detectados e removidos da amostra original através da recomendação proposta por Dixon (Dixon, 1953). A Tabela I mostra o número total de análises, os outliers

detectados, seus valores e o número total de análises após a remoção dos outliers para cada um dos parâmetros hematológicos mensurados.

Calculo dos intervalos de referência: O programa RefVal 4.10 Beta (Solberg, 2004) foi utilizado para o cálculo dos intervalos de referência. Este programa realiza os cálculos dos valores de referência através das fórmulas e recomendações da IFCC (Solberg, 1987 parte 5). Os percentis 2.5 (mínimo) e 97.5 (máximo) e os intervalos de confiança foram calculados por estimativas não paramétricas, através do método de bootstrap. (Harris & Boyd, 1995; Horn & Pesce, 2003).

Análises estatísticas: Os dados foram analisados para uma distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov e testados quanto às diferenças através do teste t para amostras pareadas. Para as análises estatísticas e confecção dos gráficos foi utilizado o programa Microcal Origin 6.0.

Tabela I – Número total de sujeitos e *outliers* removidos nos parâmetros hematológicos.

Análise	Número de Sujeitos	Número de Outliers	Valor Removido	Número Final de Sujeitos
Contagem de	126	2	3,52	124
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)			6,19	
Hematócrito (%)	126	1	32,3	125
Hemoglobina (g/dL)	126	1	9,8	125
VCM (fL)	126	1	70,6	125
HCM (pg)	126	1	21,3	125
RDW (%)	126	0	--	126
Leucócitos ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	126	0	--	126
Linfócitos (%)	126	0	--	126
Linfócitos ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	126	0	--	126
Neutrófilos (%)	126	0	--	126
Neutrófilos ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	126	0	--	126
MXD (%)	126	1	35,2	125
MXD ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	126	0		126

RESULTADOS

Os dados apresentados na Tabela II mostram os intervalos de referência mínimo (percentil 2.5) e máximo (percentil 97.5) para os valores da série vermelha do grupo de sujeitos praticantes de atividade física diária (cerca de 3 horas) mas não atletas, comparados com os

valores de indivíduos não praticantes de atividade física com faixa etária semelhante, fornecidos na literatura para o analisador hematológico Sysmex® (Bossche et. al., 2002).

Tabela II. Intervalos de referência para série vermelha em indivíduos fisicamente ativos comparados com valores da literatura.

Série Vermelha	Intervalo de Referência*	Intervalo de Referência**	I.C. 90%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Contagem de Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	3,98 – 5,47	4,34 – 5,57	4,0 – 4,48	5,45 – 5,61
Hematócrito (%)	35,0 – 46,0	40,4 – 47,5	38,0 – 40,9	47,0 – 47,7
Hemoglobina (g/dL)	12,9 – 16,4	12,9 – 15,7	12,6 - 13,2	15,3 – 16,0
VCM (fL)	82,4 – 97,3	81,7 – 95,4	78,0 – 83,2	94,3 – 98,7
HCM (pg)	28,0 – 34,2	25,7 – 31,6	24,0 – 26,6	31,4 – 34,0
RDW (%)	12,2 – 14,8	12,0 – 15,3	11,8 - 12,0	14,2 – 15,8

I.C.= Intervalo de Confiança. *valores da literatura para uma população não fisicamente ativa, dados retirados de Bossche et. al., (2002). ** valores calculados para indivíduos fisicamente ativos.

Observa-se que o grupo analisado apresentou uma faixa mais estreita de valores mínimos e máximos. A contagem de hemácias ($4,34- 5,59 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{L}$) e hematócrito (40,4 – 47,5%) nesse grupo foram ligeiramente mais elevados que em uma população não praticante de atividade física.

A Tabela III mostra os intervalos de referência mínimo (percentil 2.5) e máximo (percentil 97.5) para os valores da série branca para o grupo de sujeitos praticantes de atividade física diária mas não atletas, comparados com os valores de indivíduos não praticantes de atividade física com faixa etária semelhante, fornecidos na literatura para o analisador hematológico Sysmex® (Bossche et. al., 2002).

Tabela III. Intervalos de referência para série branca em indivíduos fisicamente ativos comparados com valores da literatura.

Série Branca	Intervalo de Referência*	Intervalo de Referência**	I.C. 90%	
			Limite Inferior	Limite Superior
Leucócitos ($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)	3,45 – 9,76	4,4 – 10,5	3,6 – 5,1	9,7 – 10,7
Linfócitos (%)	17,6 – 47,6	16,9 - 47,3	13,8 - 19,2	43,6 – 54,5
Linfócitos ($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)	0,98 – 2,85	1,2 - 3,25	1,1- 1,4	3,05 – 4,4

Neutrófilos (%)	40,2 – 74,7	39,7 – 73,9	36,2– 43,1	70,2 – 77,1
Neutrófilos ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	1,56 – 7,08	1,7 - 7,0	0,3 - 2,2	6,5 - 7,9
MXD (%)	0,3 – 13,5	4,5 – 18,6	4,3 – 5,5	17,0 – 21,0
MXD ($10^3\text{cel}/\mu\text{L}$)	0,06 – 0,64	0,3 - 1,6	0,24 - 0,37	1,40 - 1,97

I.C.= Intervalo de Confiança. *valores da literatura para uma população não fisicamente ativa, dados retirados de Bossche et. al., (2002). ** valores calculados para indivíduos fisicamente ativos.

Observa-se que houve um ligeiro aumento no número de leucócitos totais ($4,4\text{--}10,5 \times 10^3\text{cel}/\mu\text{L}$), associado ao aumento no número de linfócitos, basófilos, monócitos e eosinófilos no grupo de pessoas fisicamente ativas.

Efeitos do treinamento de endurance sobre o eritograma

A Tabela IV apresenta os resultados das análises da série vermelha (média $\pm$ desvio padrão) nos quatro momentos do período de treinamento que antecederam o teste de aptidão física e imediatamente após o teste de aptidão física no grupo monitorado mensalmente.

Tabela IV. Valores da série vermelha durante o período de treinamento ($n = 56$) e após o teste de aptidão física ($n = 38$).

Intervalos	RBC ($10^6\text{cel}/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	RDW (%)
C0	$4,83 \pm 0,29$	$14,4 \pm 0,7$	$42,9 \pm 2,1$	$89,2 \pm 3,0$	$29,9 \pm 1,2$	$12,7 \pm 0,6$
C1	$4,96 \pm 0,29^a$	$14,7 \pm 0,8^a$	$44,0 \pm 2,1^a$	$88,9 \pm 2,9$	$29,8 \pm 1,3$	$12,8 \pm 0,6$
C2	$4,9 \pm 0,31^a$	$14,6 \pm 0,8$	$43,8 \pm 2,4^a$	$89,4 \pm 3,0$	$29,8 \pm 1,3$	$12,6 \pm 0,6$
C3	$4,89 \pm 0,32$	$14,4 \pm 0,9^b$	$43,6 \pm 2,5^a$	$89,2 \pm 3,0$	$29,5 \pm 1,2^a$	$12,7 \pm 0,6$
C4	$5,0 \pm 0,31$	$14,57 \pm 0,75$	$44,3 \pm 2,0$	$88,9 \pm 3,0$	$29,2 \pm 1,6$	$12,9 \pm 0,9$

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão

^a $p < 0,05$ (em relação a C0)

^b $p < 0,05$ (em relação a C1)

Observa-se que houve uma melhora significativa nos parâmetros RBC, Hb e Hct após o primeiro e segundo mês quando comparados com os valores do início do treinamento, sem alteração no tamanho das hemácias. Esses parâmetros também não se alteraram significativamente após o teste de aptidão física. Na primeira coleta, quatro indivíduos (7,1%) apresentavam valores de contagem de hemácias diminuídos em relação ao intervalo de referência do grupo ($4,34-5,59 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{L}$). Na segunda coleta todos os sujeitos apresentaram valores da série vermelha acima do valor mínimo. Durante o estudo foi detectado um indivíduo (1,8%) com microcitose ($\text{VCM}=79,3\text{fL}$ e $\text{RDW}=16,7\%$) e hipocromia ($\text{HCM}=24,3 \text{ pg}$ e $\text{CHCM}=30,7$), sugestivo de deficiência de ferro. O sujeito apresentou melhora progressiva após intervenção da equipe médica responsável. Foi observado também um indivíduo com exames sugestivos de talassemia ($\text{VCM} = 70,6 \text{ fL}$, $\text{HCM} = 21,3 \text{ pg}$ e $\text{RBC} = 6,19 \times 10^6 \text{ cel}/\mu\text{L}$).

A Tabela V apresenta os resultados das análises da série branca como média $\pm$ desvio padrão nas mesmas condições anteriores.

Tabela V. Valores da série branca durante o período de treinamento e pós-teste de aptidão física

Intervalos	WBC ($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)	Linfócitos($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)	Neutrófilos($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)	MXD($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)	PLT ($10^3 \text{ cel}/\mu\text{L}$)
C0	$6,89 \pm 1,81$	$2,07 \pm 0,57$	$4,01 \pm 0,21$	$0,8 \pm 0,27$	223 ± 52
C1	$7,57 \pm 1,62^a$	$2,47 \pm 0,59^a$	$4,25 \pm 0,18$	$0,84 \pm 0,28$	225 ± 51
C2	$7,64 \pm 1,93^a$	$2,2 \pm 0,52^a$	$4,52 \pm 0,21$	$0,91 \pm 0,27^a$	219 ± 49
C3	$6,81 \pm 1,45^b$	$2,1 \pm 0,52^c$	$3,84 \pm 0,17^b$	$0,85 \pm 0,36^b$	208 ± 44
C4	$7,36 \pm 1,54$	$2,42 \pm 0,62$	$4,13 \pm 1,28$	$0,7 \pm 0,2$	218 ± 52

Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão

^a $p < 0,05$ (em relação a C0)

^b $p < 0,05$ (em relação a C2)

°p<0,05 (em relação a C1)

Observa-se que após o primeiro mês de treinamento os valores de leucócitos totais e linfócitos dos sujeitos aumentaram significativamente, sendo que os linfócitos retornaram para valores mais baixos nos meses subseqüentes. Já o número de neutrófilos e o conjunto de monócitos, basófilos e eosinófilos exibiram um pico de resposta mais tardio, aumentando significativamente após o segundo mês de treinamento, e retornando para valores mais baixos no último mês de análise. Esses mesmos parâmetros exibiram tendência de aumento após o teste de aptidão física. Os valores da contagem de plaquetas não sofreram alteração durante o estudo.

Na primeira coleta, três indivíduos (5,3%) apresentaram número de leucócitos totais abaixo do intervalo de referência e dois sujeitos (3,5%) acima do intervalo de referência. No segundo e terceiro mês de treinamento seis indivíduos (10,7%) permaneceram com contagem de leucócitos acima do intervalo de referência para o grupo. Porém, na última coleta antes dos testes físicos os valores da série branca de todos os sujeitos se encontravam dentro do intervalos de referência para o grupo. Após o teste de aptidão física apenas um indivíduo (1,8%) apresentou valores de leucócitos totais elevados.

DISCUSSÃO

A análise descritiva de dados laboratoriais em conjunto com valores de referência obtidos em uma população com características específicas é um instrumento importante, pois permite a detecção de sujeitos com valores aumentados ou diminuídos em relação ao grupo e a ele próprio, permitindo a individualização do programa de treinamento ou intervenção médica/nutricional quando necessário. Embora existam estudos que analisam os dados de vários estudos, utilizando para isso a meta-análise, eles não invalidam a obtenção de valores referência da nossa população, obtida de um grande número de sujeitos, de faixa etária definida e representativa de diferentes regiões do país. Os valores médios encontrados nos sujeitos monitorados

mensalmente de HGB e Hct foram de 14,5 (faixa entre 12,4 – 16,6) e 43,6% (faixa entre 37,3 – 49,4%), respectivamente, com alguns sujeitos com valores máximos ligeiramente superiores aos valores de referência do grupo (Tabela II). Esses dados estão em concordância com valores obtidos em estudos semelhantes sobre os efeitos do treinamento de *endurance* (Malcovati et al., 2003; Fallon et al., 2004).

Os valores médios de leucócitos totais $7,2 \times 10^3$ cel/ μ L (faixa entre 3,8 – 12,7) e a proporção de linfócitos e neutrófilos observados no grupo de sujeitos também estão em concordância com dados da literatura (Malcovati et al., 2003; Fallon et al., 2004; Malm et al. 2004). Da mesma forma que o observado para a série vermelha, os valores máximos dos sujeitos monitorados mensalmente foram ligeiramente superiores ao intervalo de referência determinado. Esses dados sugerem que para alguns sujeitos em algum dos momentos o treinamento foi mais estressante, e provavelmente mais lesivo, do que para o restante do grupo.

Os dados apresentados nesse estudo mostraram tanto a resposta aguda na série vermelha, observada após um mês do início do treinamento, como a resposta adaptativa, observada após três meses de treinamento. A análise do comportamento da série vermelha nos diferentes momentos mostrou aumento significativo no hematócrito, concentração de hemoglobina e contagem de hemácias já no primeiro mês de treinamento, com manutenção de valores significativamente mais altos nos meses subseqüentes. Essa é uma adaptação positiva esperada quando planejamos um treinamento com características aeróbicas (maior volume e menor intensidade): priorizar os mecanismos de captação e transporte de O_2 para os tecidos. O tamanho das hemácias não se alterou com o treino em nenhum momento. Esses dados sugerem que o treinamento empregado atingiu o objetivo proposto, pois induziu aumento no número das hemácias circulantes, com provável melhora no aporte de O_2 .

A observação de indicadores de tamanho das hemácias tais como valores de VCM e RDW é importante, principalmente no diagnóstico de anemias que podem ocorrer nos praticantes de

esportes de endurance (Malcovati et al., 2003). A forma de anemia mais freqüentemente observada em atletas e na população em geral está associada com a deficiência de ferro, embora sua prevalência em atletas seja geralmente baixa, em torno de 3% (Fallon et al., 2004). Nestes casos o VCM encontra-se diminuído (< 80 fL) e o RDW elevado ($>15,0\%$). Além disso, o VCM entre 60 e 70 fL em atletas jovens com níveis muito baixos de hemoglobina e elevação no número de hemácias é altamente sugestivo de talassemia (Malcovati et al., 2003). Nesse estudo detectamos um sujeito com quadro compatível com anemia ferropriva e outro compatível com talassemia, permitindo uma rápida intervenção e recuperação.

Muitos estudos têm reportado um aumento imediato nos neutrófilos e linfócitos circulantes durante e após o exercício, que se correlacionam com o aumento nos níveis plasmáticos dos hormônios epinefrina e cortisol (Pyne, 1994; 2004; Ronsen et al., 2001; McCarthy & Dale, 1988). Os leucócitos totais, como parte não-específica do sistema imune, são os primeiros a responder à lesão tecidual e são indicativos de uma resposta inflamatória às microlesões produzidas pelo exercício. Os dados apresentados nesse estudo (Tabela V) mostraram que o aumento nos linfócitos precedeu o aumento nos neutrófilos, embora ambos estivessem dentro do limite superior estabelecido. O intervalo de referência dos linfócitos determinado para os indivíduos fisicamente ativos foram ligeiramente superiores aos reportados normalmente na literatura (Tabela IV), uma adaptação esperada do sistema imune ao treinamento (Pedersen & Toft, 2000).

Os dados apresentados nesse estudo sugerem que o treinamento foi bem planejado e possibilitou uma adaptação positiva, observada no hemograma dos sujeitos, com aumento inicial nas células da série branca sem persistência de valores de leucócitos elevados ao final do período preparatório. O mesmo foi observado após o teste de aptidão física. É importante ressaltar que todos os 56 sujeitos avaliados obtiveram índice entre 6 e 10 no referido teste, cuja nota de corte era 5, confirmando o efeito benéfico do treinamento. Considerando que a maioria dos sujeitos analisados eram sedentários até o início do macrociclo de treinamento de três meses, o conjunto de dados obtidos nesse estudo corroboram que o treinamento não induziu

desgaste excessivo no grupo, conferindo, ao contrário, maior resistência muscular, importante para a performance no teste físico.

Embora muitos estudos que avaliaram os efeitos do exercício tenham mostrado aumento nos valores de vários constituintes plasmáticos, a sua maioria não considerou o possível efeito de hemoconcentração do sangue (Parry-Billings et al. 1992; Babij et al., 1983). Em nosso estudo, as mudanças de volume plasmático após três meses de treinamento não foram significativas, feitos os cálculos do percentual de variação do volume plasmático através da fórmula de Dill & Costill (1974). Esses dados indicam que esse tempo de treinamento (3 meses) não foi suficiente para induzir aumento na variação do volume plasmático, adaptação observada em atletas de endurance com mais tempo de treinamento (El-Sayed et al., 2005).

CONCLUSÕES

As respostas adaptativas ao treinamento ocorrem com a finalidade de preparar o organismo para eventos de maior estresse. Para diferenciar a adaptação positiva da condição de mal-adaptação induzida pelo treinamento através da análise do hemograma, é fundamental conhecer intervalos mínimos e máximos de referência para uma população com condições periodizadas de treino. Somente dessa forma é possível entender as variações que podem ocorrer durante o período de treinamento. Os resultados apresentados nesse estudo mostraram que os valores de referência mínimos e máximos de todos os parâmetros hematológicos estavam de acordo com os limites observados em outros estudos (Sharp, K., et al., 2002; Malcovati et al. 2003; Fallon et al., 2004; Nikolaidis, et al., 2003). Dentro dessa faixa foi possível observar a resposta adaptativa induzida pelo macrociclo de treinamento nos marcadores utilizados. Esses dados são importantes, uma vez que os estudos que relacionam o efeito crônico do treinamento sobre parâmetros hematológicos são ainda escassos na literatura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os sujeitos voluntários da pesquisa e ao Alto Comando da Escola Preparatória de Cadetes do Exército (EsPCEEx) de Campinas, que permitiu a realização desse estudo. Agradecemos ainda a biomédica Ana Porto e aos educadores físicos Madla Adami dos Passos e Lucas Samuel Tessuti pela assessoria técnica prestada. Esse estudo foi financiado pelas agências brasileiras Fapesp e CNPq (03/09923-2P). Lazaro A. S. Nunes foi bolsista Capes.

CAPÍTULO 2

2º artigo [Clinical Journal of Sports Medicine. Status: aceito. Fator de Impacto: 2.783 (Fonte: periódicos Capes)]

Adequacies of skin puncture for evaluating biochemical and hematological blood parameters in athletes.

Lázaro Alessandro S. Nunes^{1*} MS, Paulo Guimarães Gandra¹, Armindo Antonio Alves², Lauro T. Kubota³, Denise Vaz de Macedo¹

¹ Laboratório de Bioquímica do Exercício-LABEX, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/nº, Barão Geraldo, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

² Centro Universitário Hermínio Ometto, Uniararas – Rua Maximiliano Baruto, 500 – Araras-SP.

³Instituto de Química, Universidade de Campinas, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/nº, Barão Geraldo, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

* Corresponding author: phone 005519 3788 6145, fax 005519 3788 6129; e-mail: labex@unicamp.br.

Acknowledgments

The authors thank the athletes who participated in this study and Fernando Catanho, Danilo Ferrucci, Clodoaldo Dechechi and Rodrigo Leitão from the Labex staff for technical assistance. This study was supported by the Brazilian agencies FAPESP (03/09923-2P) and CNPq. Lázaro Alessandro S. Nunes and Paulo G. Gandra received grants from the Brazilian agency CAPES.

Abstract

Objective: This study tested the effect of blood sampling (skin versus venous puncture) on some biochemical and hematological blood parameters in athletes to answer whether skin puncture could be used as a substitute for venous puncture.

Design: Comparative study of two methods of blood samples collection.

Setting: The blood was collected in the same athletes of indoor soccer and handball teams at three different moments of the preparatory training phase.

Participants: Fourteen male indoor soccer players (22 ± 1 years old) and 7 female handball players (18 ± 1 years old) participated.

Main Outcome Measurement: For the biochemical analyses, 10 mL and 500 μ L of blood was collected in heparin and for the hematological analyses 4 mL and 200 μ L of blood were sampled in K₃EDTA by Vacutainer® BD or Microvette® Sarstedt system.

Results: There was no significant statistical difference between the two kinds of methods for the values of creatine kinase, urea, creatinine, lymphocytes and platelets. The other hematological analyzes and uric acid exhibited significant higher values in skin blood, although it was observed a high degree of correlation between the two techniques for all parameters, which were all within the normal expected range.

Conclusions: Skin puncture is a reliable, easy, accurate and less invasive sampling method for assessing hematological and these biochemical parameters in athletes, respecting that blood samples should always be obtained from the same site, especially in follow-up studies.

Key words: Skin puncture, venous puncture, creatine kinase, hematological parameters.

1. Introduction

The monitoring of some biochemical and hematological blood parameters may be a powerful methodology for evaluating individual physical stress threshold in athletes during a competitive season. Physical activity is known to influence the blood cell system, the vascular volumes and also plasma biochemical parameters on long and short-term basis (1). Even so, the utility and validity of blood training monitoring is highly controversial, probably because such evaluations require frequent and successive blood samplings, which normally is done by venous puncture, stressful for some individuals. Skin puncture requires a very low blood volume and could allow the collection of successive blood samplings from athletes without disturbing their routine. Now, the very low blood volume necessary for analyses in automatic equipment should also be considered.

Such advantages have been shown for blood sampling in children, where venous puncture is usually needed in two or more successive samplings to get sufficient blood volume (2), being strongly suggested as a useful tool for monitoring also old people (2), or patients with cancer, burn injury or obesity (3). Some few studies have validated skin puncture for measuring dosages of glucose (4), potassium, phosphorous, sodium, bilirubin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and lactate dehydrogenase in healthy adult volunteers of both sexes (3,4) and growth hormone of cyclists (5).

Despite these advantages, the fluid obtained by skin puncture is a mixture of blood from arterioles, venulae, capillaries and probably intercellular fluid (2,3). Thus, before this technique replaces venous puncture, it is necessary to show whether the blood parameters of interest are not affected by the sampling technique; and it is also important to observe whether the mean values are within the normal range used for clinical purposes (3). The objective of this study was to test the effect of blood sampling collection (skin versus venous puncture) on biochemical (creatine kinase, urea, creatinine and uric acid) and haematological blood parameters (total count

of leukocytes and erythrocytes; hemoglobin; haematocrit; mean corpuscular volume – MCV; platelets; lymphocytes; neutrophils and the mean sized leucocytes (representing monocytes, eosinophils and basophils) in athletes during a preparatory training period, to answer whether skin puncture is a suitable alternative to venous puncture for assessing these blood parameters.

2. Methods

Fourteen male indoor soccer players (22 ± 1 years old) and 7 female handball players (18 ± 1 years old) participated in this study. None of them showed any history of cardio respiratory, hepatic or metabolic disease. The study consisted of collecting blood in the same 21 athletes at different moments of the preparatory period by both venous and skin punctures for further correlations, resulting from 21 to 54 samples; accordingly, some magnitudes were analyzed once and others more than twice. Data were analyzed irrespective of sex and sports modality as the objective was to answer whether skin puncture could be used as a substitute for venous puncture by such analyses. Samples from venous and skin blood were analyzed in the same batch. The samples were taken always 48 h after training period to avoid acute effects of training on the results. The experimental protocol of this research was approved by the Research Ethics Committee of Dentistry School of State University of Campinas, Brazil (019/2004).

For the biochemical analyses, 10 mL of blood was collected in heparin by Vacutainer® BD system and centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min under refrigeration (4°C) to separate plasma. For the hematological analyses, 4 mL of blood were sampled in ethylenediaminetetraacetic acid tripotassium salt (K_3EDTA). Immediately after this procedure, the skin puncture was performed. Capillary blood was collected from the middle finger pad after it was cleaned with ethyl alcohol 70% and dry gauze to avoid alcohol residues, which may promote hemolysis and affect hemoglobin and creatine kinase dosages. A lancet device, the Accu-chek® Softclix Pro, was used

to guarantee proper depth of penetration for blood collection. The first blood drop was discarded to avoid interference of interstitial and intracellular fluids. The puncture area was then gently pressured without repetitive movements (milking) to allow free blood flow into the collecting tube. Firstly, 200 μ L of blood was collected in EDTAK₃ by Microvette® Sarstedt 200. Then, 500 μ L of blood was collected in heparin by Microvette® Sarstedt 500, and immediately centrifuged at 3500 x g under 4°C for 15 min in a microcentrifuge.

Hematological analyses were run in an automatic Sysmex KX-21N. The biochemical analyses were developed with Wiener lab kits run in an automatic Autolab Boehringer, in the same batch. Enzymatic plasma activity of creatine kinase was obtained at 37°C. The internal quality control for analytes was run along with the tests, by means of the commercial serum control Wiener lab Standatrol SE 2 levels.

Statistical comparisons of means used Student paired t test. Pearson's correlation (r) and linear regression were also calculated. Correlation analyses were run in Microcal Origin 6.0. Significance was considered for $p < 0.05$.

3. Results

Table 1 shows mean values of the hematological and biochemical parameters obtained by both skin and venous puncture. Only platelets and lymphocytes exhibited no significant differences between the two methodologies. The other hematological parameters such as erythrocytes, hemoglobin, haematocrit, total leukocyte count, neutrophils, monocytes, basophils and eosinophils were significantly higher in blood sampled by skin puncture, while MCV was lower by this technique. With respect to biochemical parameters, the plasma creatine kinase activity, urea and creatinine concentrations exhibit no significant differences between the two methodologies. It is important to point out that the relative differences between mean values of

skin to venous blood systematically vary between 2-6% for all analyzed parameters but the variance (SD^2) of each data set was maintained constant.

Figure 1 presents the correlation obtained by both skin and venous puncture for the analyzed parameters.

4. Discussion

This study demonstrated a significantly higher erythrocytes (2,05%), hemoglobin (2,05%) and haematocrit (2,33%) and lower MCV (0,45%) in skin puncture blood than venous blood ($p < 0.05$). These results are in line with Daae et al. (6) who also described mean values of erythrocytes, hemoglobin and haematocrit slightly higher. However, the mean values shown in Table 1 are all within the normal clinical range as described in Kjeldsberg (7): hemoglobin = 130 to 180 g/L; erythrocytes = 4.4 to $5.9 \times 10^{12}/L$; haematocrit = 0.40 to 0.52L/L; and MCV = 80 to 100 fL.

We also observed a significantly higher total leukocyte count (2,83%), neutrophils (1,51%) and monocytes, basophils and eosinophils (6,1%) between the two methodologies, but all of them also are within the normal range of values (7). Platelets were not affected by the collecting technique, a result confirmed by Yang (8). An anterior study (6) had shown higher platelets levels when blood was collected by venous puncture as compared with skin puncture. Probably the automatic equipment used (6) was less sensitive than what is now available.

The plasma creatine kinase activity, urea and creatinine concentrations exhibit no significant differences between the two methodologies, although they also exhibit a mean relative difference between 1.5 to 4.5% from finger to venous blood. There have been few studies to determine whether skin puncture blood is a suitable alternative to venous blood concerning these biochemical parameters. No effect was also reported by Falch for urea dosages, but the concentrations of creatinine were 6.6% lower in skin puncture than in venous puncture (3).

Our results reported that uric acid was affected by sampling methodology, with higher mean values in blood obtained by skin puncture (6,45%). However, again the mean values are all within the normal clinical range for males 0.21 – 0.45 and females 0.14 – 0.36 mmol/L (9). There are no studies comparing uric acid levels by either technique.

In our study urea, uric acid, leukocytes, erythrocytes and hemoglobin show strong significant positive correlation between the two techniques, in accordance with others (4,6). Plasma creatine kinase activity showed the highest correlation. Jedeikin et al. (10) also reported such a correlation for creatine kinase and its isoenzymes between digital sampling and blood from the umbilical cord in newborn humans. Others parameters also showed strong correlation (haematocrit: $r=0.9288$, MCV: $r=0.9745$, lymphocytes: $r=0.9665$, neutrophils: $r=0.9481$). Only creatinine ($r=0.6950$) and platelets (0.7480) showed poor correlation. Note that these correlations occurred even in the parameters where the mean values were affected by the sampling technique. Moreover, the significant mean differences found in some parameters are all within the normal expected range (7,9)

The mean relative difference between skin and venous mean values (bias) for all parameters was 2.1%,. However, variance of each data set was maintained constant. This suggests that skin puncture systematically over-estimated these parameters about 2%. Thus, the differences found here may partly explained by peripheral ultrafiltration of intravascular fluid, leading to haemoconcentration of skin-puncture blood.

The data presented here reinforce the validity of skin puncture (the sampling of which is simple and more acceptable to most athletes) use as a substitute for venous puncture to measure these parameters.

4. Conclusion

Skin puncture may be considered a reliable, easy, accurate and less invasive sampling method for assessing hematological and biochemical parameters such as creatine kinase, urea, uric acid and creatinine in athletes during a competitive period, respecting that the blood samples should always be obtained from the same site, especially in follow-up cases.

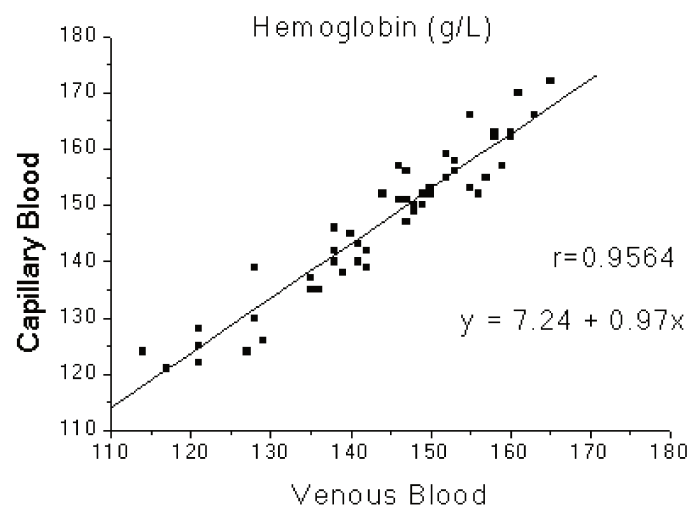
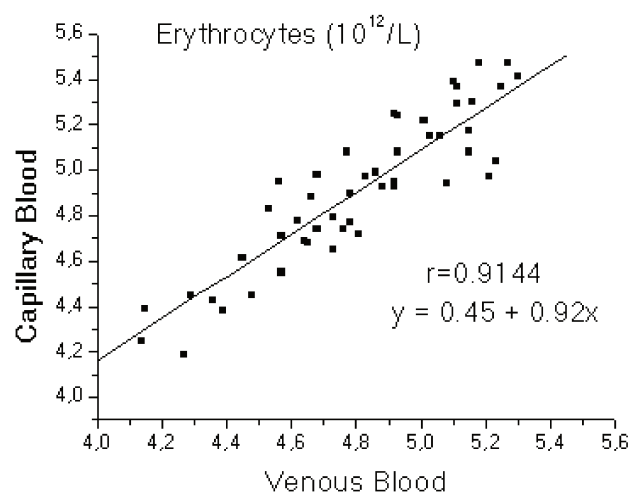
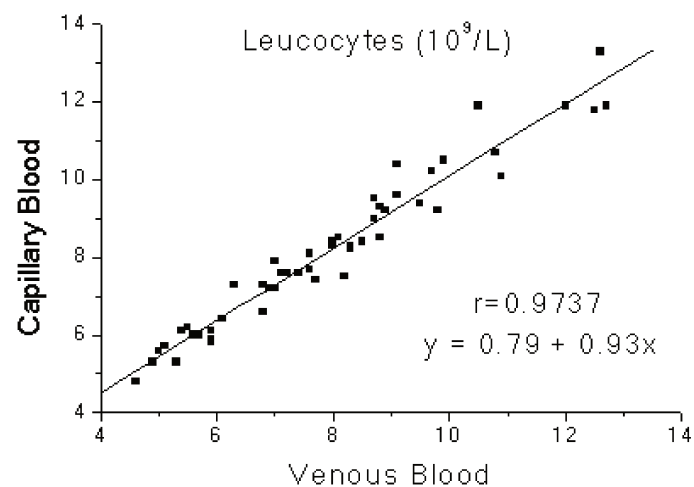
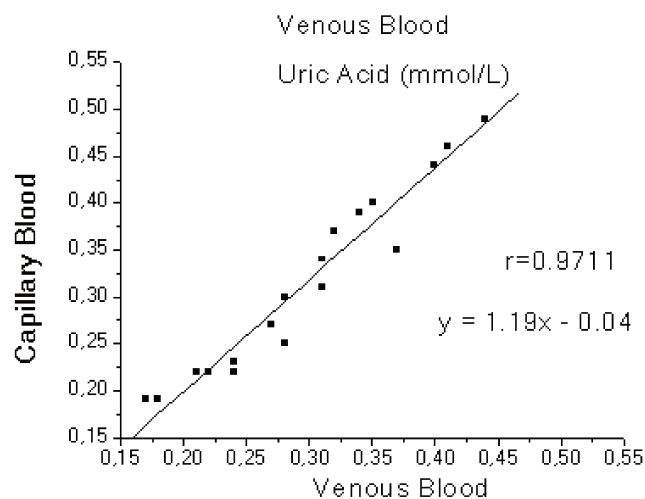
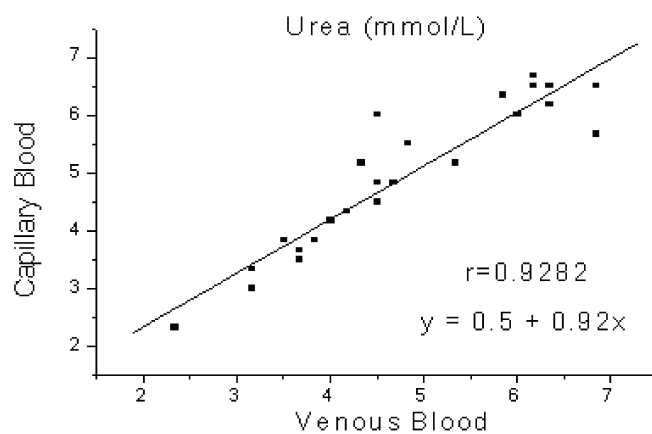
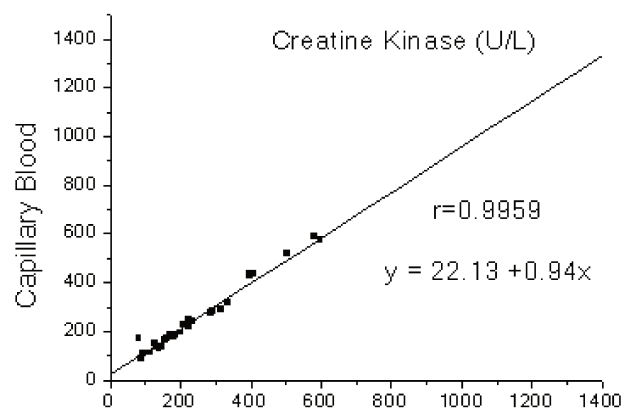
Table 1. Effects of blood sampling on biochemical and hematological blood parameters in athletes.

Blood Analyses	n	Skin	Venous	Relative	P value
		Puncture	Puncture	difference of	
		means (%)			
<i>Hematological</i>					
<i>Parameters</i>					
Total Leukocyte Count	51	8.13 ± 2.03 ^a	7.9 ± 2.12	2.83	0.0551*
(WBC) (10 ⁹ /L)					
Erythrocytes (10 ¹² /L)	54	4.88 ± 0.35	4.78 ± 0.34	2.05	<0.01*
Hemoglobin (g/L)	53	146 ± 13.6	143 ± 13.4	2.05	<0.01*
Haematocrit (L/L)	48	0.43 ± 0.37	0.42 ± 0.37	2.33	<0.01*
MCV (fL)	51	89.1 ± 2.6	89.5 ± 2.6	-0.45	<0.01*
Platelets (10 ⁹ /L)	52	231 ± 54	229 ± 45	0.87	0.6415
Lymphocytes (10 ⁹ /L)	50	2.67 ± 0.64	2.56 ± 0.61	4.12	0.0875
Neutrophils (10 ⁹ /L)	50	4.64 ± 0.68	4.57 ± 0.65	1.51	0.0497*
Monocytes, Eosinophils	50	0.82 ± 0.25	0.77 ± 0.22	6.10	0.0428*
and Basophils (10 ⁹ /L)					
<i>Biochemical Parameters</i>					
Creatine kinase (IU/L)	32	283 ± 241	278 ± 256	1.77	0.3693
Creatinine (μmol/L)	22	76.9 ±16.8	80.4 ± 18.6	4.55	0.3051
Urea (mmol/L)	25	4.91 ± 1.25	4.8 ± 1.25	2.24	0.1354
Uric acid (mmol/L)	21	0.31 ± 0.1	0.29 ± 0.07	6.45	< 0.01*

^a Values expressed as mean ± SD; n= number of samples; *Statistically significant difference between venous and skin punctures ($p < 0.05$). Relative difference skin puncture to venous puncture: (mean skin puncture – mean venous puncture)/mean skin puncture.

FIGURE LEGEND

Fig.1. Pearson's correlation for blood parameters sampled by both venous and digital (capillary) punctures in athlete during training period. Data show significant correlations.



References

1. Smith LL. Tissue Trauma: The Underlying Cause of Overtraining Syndrome? J. Strength Cond. Res. 2004;18(1):184-91.
2. Blumenfeld TA, Hertelendt WG, Ford SH. Simultaneously obtained skin-puncture serum, skin-puncture plasma, and venous serum compared, and effects of warming the skin before puncture. Clin Chem 1977;23:1705-10.
3. Falch DK. Clinical Chemical analyses of serum obtained from capillary versus venous blood, using Microtainers® and Vacutainers®. Scand J Clin Lab Invest 1981;41:59-62.
4. Kupke IR, Kather B, Zeugner S. On the composition of capillary and venous blood serum. Clinica Chimica Acta 1981;112:177-85.
5. Godfrey RJ, Whyte G, McCarthy J, Nevill A, Head A. The validity of capillary blood sampling in the determination of human growth hormone concentration during exercise in men. Br J Sports Med 2003;38:e27.
6. Daae LN, Halvorsen S, Mathisen PM, Mironska K. A comparison between haematological parameters in “capillary” and venous blood from healthy adults. Scand J Clin Lab Invest 1988;48:723-6.
7. Kjeldsberg C. Normal Values of blood and bone marrow in human. In: Lee RG, Bithell TC, eds. Wintrobe’s Clinical Hematology, 8th ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1981:2531-43.
8. Yang ZW, Yang SH, Chen L, Qu J, Zhu J, Tang Z. Comparison of blood counts in venous, fingertip and arterial blood and their measurement variation. Clin Lab Haem 2001;23:155-9.
9. Grossi E, Colombo R, Cavuto S, Franzini C. The REALAB: a new method for the formulation of reference intervals based on current data. Clin Chem 2005;7: 1232-40
10. Jedeikin R, Makela SK, Shennan AT, Rowe RD, Ellis G. Creatine kinase isoenzymes in serum from cord blood and the blood of healthy full-term infants during the first three postnatal days. Clin Chem 1982;28:317-22.

Date: Aug 14, 2006
To: "Lázaro Alessandro Nunes" lazaro@unicamp.br
From: "CJSM" cjsm@ucalgary.ca
Subject: Final Review Outcome

RE: CJSM-06-50R2, entitled "Adequacies of skin puncture for evaluating biochemical and hematological blood parameters in athletes"

Dear Mrs Nunes,

I am pleased to inform you that your work has been accepted for publication in Clinical Journal of Sport Medicine. All manuscript materials will be forwarded immediately to the production staff for placement in an upcoming issue.

You should receive galley proofs within the next 4-6 weeks. At that time, you will be requested to read the proofs but will only make MINOR, necessary changes. You will also be able to order reprints at that time.

On behalf of the Clinical Journal of Sport Medicine, I thank you for allowing us to review this manuscript. I am certain the scientific and medical communities will find it interesting and useful.

<http://cjsm.edmgr.com/>

Your username is: *****

Your password is: *****

With Kind Regards,

Dr. Willem Meeuwisse, MD, PhD
Editor-in-Chief
Clinical Journal of Sport Medicine

CONCLUSÕES FINAIS

CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ Os resultados obtidos neste estudo para os intervalos de referência em uma população fisicamente ativa mostraram poucas alterações quando comparados aos valores observados na literatura para uma população de mesma faixa etária não praticante de atividade física. Encontramos faixas de valores mais estreitos e valores limites superiores ligeiramente mais elevados.
- ✓ O acompanhamento dos marcadores sanguíneos durante o período de preparação para o teste de aptidão física de caráter eliminatório permitiu que as cargas de treino fossem individualizadas quando necessário, de forma a permitir uma adaptação positiva, que se refletiu nos parâmetros da série vermelha e no resultado do teste eliminatório, onde todos os participantes do estudo obtiveram índices acima do mínimo exigido.
- ✓ A técnica de coleta por punção digital apresentou diferenças estatísticas em alguns parâmetros, porém sem significância clínica.
- ✓ A técnica de coleta por punção digital é uma alternativa prática, menos invasiva e que se mostra viável para a utilização no monitoramento de atletas em períodos de treinamento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alessio, H. M. Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exercise*. v.25, p.218-224, 1993.
2. Antonini E. and Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in their Reactions with Ligands. North Holland Publishing Co., Amsterdam, The Netherlands. 1971.
3. Babij, P., Matthews, S.W., Rennie, M.J. Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man. *Eur J Appl Physiol*. v.50, p.405-411. 1983.
4. Banfi, G., Del Fabbro, M., Mauri, C., Corsi, M.M., Melegati, G. Haematological parameters in elite rugby players during a competitive season. *Clin Lab Haematol*. v.28, n3, p.183-188, 2006.
5. Baumann, H., Gauldie, J. The acute phase response. *Immunology Today*. v.15, n.2, p.74-80, 1994.
6. Benesch, R. & Benesch, R.E. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun*. v.26, n.2, p.62-7, 1967.
7. Black, S., Kushner, I., Samols, D. C-reactive Protein. *J Biol Chem*. v.279, n.47, p.48487-90, 2004.
8. Blumenfeld TA, Hertelendt WG, Ford SH. Simultaneously obtained skin-puncture serum, skin-puncture plasma, and venous serum compared, and effects of warming the skin before puncture. *Clin Chem*. v23, p1705-1710, 1977.
9. Bompa, T.O. Periodização. 4a ed. São Paulo: Phorte, 2001. 438p.
10. Bossche, J.V., Devreese, K., Malfait, R., Vyvere, M.V., Wauters, A., Neels, H. , et al. Reference Intervals for a Complete Blood Count Determined on different Automated Haematology Analysers : Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med*. v.40, n.1, p69-73, 2002.
11. Bruin, G., Kuipers, H., Keizer, H.A. and Vandervusse, G.J. Adaptation and overtraining in horses subjected to increased training loads. *J. Appl. Physiol*. v.76, p.1908-1913, 1994.
12. Calich, V., Vaz, C. Imunidade natural e inflamação. In: Imunologia, Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 2001. p.11-30.
13. Colley, C.M., Fleck, A., Goode, A.W., Muller, B.R., Myers, M.A. Early time course of the acute phase protein response in man. *J. Clin. Pathol*. v.36, p.203-207, 1983.

14. Costill, D.L., Flynn, M.G., Kirwan, J.P., Houmard, J.A., Mitchell, J.B., Thomas, R., Park, S.H. Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.20, n.3, p.249-254, 1988.
15. Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C.K., Procopio, J. Ácidos graxos e função dos leucócitos. *In: Entendendo a gordura: os ácidos graxos.* São Paulo: Ed. Manole, 2002. p.301-305.
16. Daae LNW, Halvorsen S, Mathisen PM, Mironska K. A comparison between haematological parameters in "capillary" and venous blood from healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest.* v.48, p723-726. 1988.
17. Davies, K.J., Quintanilha, T.A., Brooks, G.A., Packer, L. Free radical and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.107, p.1198-1205, 1982.
18. Dill, D.B., Costill, D.L. Calculation of percentage changes in volume of blood, plasma and red cells in dehydration. *J Appl Physiol.* v.37, n.2, p.247-248, 1974.
19. Dixon, W.J. Processing data for outliers. *Biometrics.* v.9, p74-89. 1953.
20. Dohm, G.L., Williams, R.T., Kasperek, G.J., et. al. A.M. Increased excretion of urea and N-methylhistidine by rats and humans after a bout of exercise. *J Appl Physiol.* v.52, p.27-33, 1982.
21. El-Sayed, M.S., Ali, N., Ali, Z.E.S. Haemorheology in exercise and training. *Sports Med.* v.35, n.8, p.649-670, 2005.
22. Falch DK. Clinical Chemical analyses of serum obtained from capillary versus venous blood, using Microtainers® and Vacutainers®. *Scand J Clin Lab Invest.* v.41, p59-62. 1981.
23. Fallon, K.E. Utility of Hematological and Iron-Related Screening in Elite Athlets. *Clin J Sport Med.* v.14, n3, p145-152. 2004.
24. Fallon, K.E., Bishop, G. Changes in Erythropoiesis Assessed by Reticulocyte Parametes During Ultralong Distance Running. *Clin J Sport Med.* v.12, p172-178, 2002.
25. Fallon, K.E., Fallon S.K., Boston, T. The acute phase and exercise: count and field sports. *Br J Sports Med.* v.35, p.170-173, 2001.
26. Fry, R.W., Morton, A.R., Keast, D. Overtraining in athletes: an update. *Sports Med.* v.12, p. 32-65, 1991.
27. Fry, R. W., Morton, A. R., Keast, D. Periodisation of training stress - a review. *Can. J. Sports and Sci.* v.17, n.03, p.234-240, 1992.

28. Fry, R.W. and Kraemer, W.J. Resistance exercise overtraining and overreaching. *Sports Med.* v.23, p.106-129, 1997.
29. Geffken, D.F., Cushman, M., Burke, G.L., et al. Association between physical activity and markers of inflammation in a healthy elderly population. *Am. J. Epidemiol.* v.153, n.3, p. 242-250, 2001.
30. Gleeson, M., Almey, J., Brooks, S., et al. Haematological and acute-phase responses associated with delayed-onset muscle soreness in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* v.71, p.137-42, 1995.
31. Godfrey RJ, Whyte G, McCarthy J, Nevill A, Head A. The validity of capillary blood sampling in the determination of human growth hormone concentration during exercise in men. *Br J Sports Med.* v.38, e27, 2003.
32. Green et al., Alterations in blood volume following short-term supramaximal exercise. *J Appl Physiol.* v.56, p245-246, 1984.
33. Grossi E, Colombo R, Cavuto S, Franzini C. The REALAB: a new method for the formulation of reference intervals based on current data. *Clin Chem.* v7, p1232-1240, 2005.
34. Harken, A.H. The surgical significance of the oxyhemoglobin dissociation curve. *Surg Gynecol Obstet.* v.144, n.6, p.935-55, 1977.
35. Harris, E.K., Boyd, J.C. Statistical bases of reference values in laboratory medicine. New York, NY: Marcel Dekker; 1995.
36. Horn, P.S., Feng, L., Li, Y., Pesce, A.J. Effect of Outliers an Nonhealty individuals on Reference Interval Estimation. *Clinical Chemistry.* v.7, n.12, p.2137-2145, 2001.
37. Horn, P.S., Pesce, A.J., Coperland, B.E. Reference intervals: un update. *Clin Chim Acta.* v.334, p5-23, 2003.
38. Jedeikin R, Makela SK, Shennan AT, Rowe RD, Ellis G. Creatine kinase isoenzymes in serum from cord blood and the blood of healthy full-term infants during the first three postnatal days. *Clin Chem.* v.28, p317-322, 1982.
39. Jensen, L.E., Whitehead, A.S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *Biochem. J.* v.334, p.489-503, 1998.
40. Kargotich, S., Goodman, C., Keast, D., Morton, A.R. The influence of exercise-induced plasma volume changes on the interpretation of biochemical parameters used for monitoring exercise, training and sport. *Sports Med.* v.26, n.2, p101-117. 1998

41. Keast, D. Immune responses to overtraining and fatigue. In: *Exercise and Immune Function*. L. Hoffman-Goetz. Boca Rotan, FL: CRC Press, p.121-141. 1996.
42. King, D.E., Carek, A.G., Mainous I.I.I., Pearson, W.S. Inflammatory markers and exercise: differences related to exercise type. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.35, n.4, p.575-581, 2003.
43. Kjeldsberg C. Normal Values of blood and bone marrow in human. In: Lee R.G. et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 8th ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1981:2531-43.
44. Koj, A., Guzek, A. Modified proteins as possible signals in the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci.* v.762, p.108-119, 1995.
45. Kuipers, H. Training and overtraining: an introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.30, n.7, p.1137-1139, 1998.
46. Kuipers, H., Keizer, H. A. Overtraining in elite athletes: review and directions for the future. *Sports Med.* v.6, p.79-92, 1988.
47. Kupke IR, Kather B, Zeugner S. On the composition of capillary and venous blood serum. *Clinica Chimica Acta.* v.112, p.177-185, 1981.
48. Kushner, I. The phenomenon of the acute phase response. *Annals New York Academy of Sciences.* v.389, p.39-48, 1982.
49. Kushner, I., Rzewnicki, D.L. The acute phase response: General aspects. *Bailliere's clinical Rheumatology.* v.8, n.3, p.513-530, 1994.
50. Lac G, Maso F. Biological markers for the follow-up athletes throughout the training season. *Pathologie Biologie.* v.52, p.43-49, 2004.
51. Lavery, I., Ingram, P. Venepuncture: best practice. *Nurs Stand.* v.19, n.49, p.55-65, 2005.
52. Lehmann, M.C., Foster, C., Keul, J. Overtraining in endurance athletes: a brief review. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.25, p.854-862, 1993.
53. Lehmann, M.C., Lormes, W., Opitz-Gress, A., et al. Training and overtraining: an overview and experimental results in endurance athletes. *J. Sports Med. Physiol. Fitness.* v.37, n.7, p.17, 1997.
54. Lehmann, M.C., Foster, C., Dickhuth, H.H. et al. Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.30, n.7, p.1140-1145, 1998.
55. Macintyre, S.S. C-reactive protein. *Methods Enzymol.* v.163, p.383-99, 1988.
56. Malcovati, L., Pascutto, C., Cazzola, M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica.* v.88, p.570-581, 2003

57. Malm, C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiol. Scand.* v.171, n.3, p.233-239, 2001.
58. Malm, C., Sjodin T.L., Sjoberg, B, Lenkei R, Renstrom P, Lundberg I.E., et al. Leucocytes, cytokines, growth factors and hormones in human skeletal muscle and blood after uphill or downhill running. *J. Physiol.* v.553, n.3, p.983-1000, 2004.
59. Marcus, A.J., Zucker, F.D. Human Platelet Lipids and Their Relationship to blood coagulation. *J Am Oil Chem Soc.* v.42, p.500-504, 1965.
60. McCarthy, D.A., Dale, M.M., The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med.* v.6, n.6, p.333-363, 1988.
61. Newsholme, E.A., Parry-Billings, M., McAndrew, N. et al. A biochemical mechanism to explain some characteristics of overtraining. In: *Advances in nutrition and sports*, F. Brouns (editor). Basel: karger. p.79-83, 1991.
62. Nieman, D.C., Cannarella, S. L. N., Fagoaga, O. R. et al. Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *J.Appl. Physiol.* v.84, n.4, p.1252-1259, 1998.
63. Nikolaidis, M.G. , Protosyggellou, M.D., Petridou, A. et al., Hematologic and biochemical profile of juvenile and adult athletes of both sexes: implications for clinical evaluation. *Int J Sports Med.* v.24, p.506-511, 2003.
64. Parry-Billings, M., Budgett, R., Koutedakis, Y. Plasma amino acid concentration in the overtraining syndrome: possible effects on the immune system. *Med Sci Sports Exerc.* v.24, p.1358-1358, 1992.
65. Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L. Exercise and Imune System: Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol Rev.* v.80, n.3, p.1055-1081, 2000.
66. Pedersen, B.K., Toft, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med.* v.34, p.246-251, 2000.
67. Perutz, M.F. Hemoglobin Structure and Respiratory Transport. *Scientific American.* v.239, p.92-125, 1978.
68. Petibois, C., Cazorla, G., Poortmans, J.R. et al. Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. *Sports Med.* v.33, p.83-94, 2003.
69. Pizza, F.X., Koh, T. J., McGregor, S. J. et al. Muscle inflammatory cells after passive stretches, isometric contractions, and lengthening contractions. *Journal of Applied Physiology.* v.92, p.1873-78, 2002.

70. Platen, P. Overtraining and the Endocrine System – Part 1: Terminology. *European Journal of Sport Science*. v.2, n.1, p.1-7, 2002.
71. Pyne, D.B. Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*. v.17, n.4, p.245-58, 1994.
72. Reid, M. B. Redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J. Appl. Physiol*. v.90, p.724-731, 2001.
73. Ridker, P. M., Stampfer, M. J., Rifai, N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA*. v.285, n.19, p.2481-85, 2001.
74. Ritchie R.F., Palomaki, G. Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med*. v.42, n.7, p.702-709, 2004.
75. Ronsen, O., Pedersen, B. K., Oritsland, T.R., et al. Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J.Appl. Physiol*. v.91, p.425-434, 2001.
76. Rowbottom, D.G., Keast, D., Goodman, C., et al. The haematological, biochemical and immunological profile of athletes suffering from the overtraining syndrome. *Eur. J. Appl. Physiol*. v.70, n.6, p.502-509, 1995.
77. Rowbottom, D.G., Keast, D., Green, S. et al. The case history of an elite ultra-endurance cyclist who developed chronic fatigue syndrome. *Med Sci Sports Exerc*. v.30, n.9, p.1345-8, 1998.
78. Schumacher, Y.O., Schmid, A., Grathwohl, D. et. al. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med. Sci. Sports Exerc*. v.34, n.5, p.869-875, 2002a.
79. Schumacher, Y.O., Jankovits, R., Bültermann, D. et al. Hematological indices in elite cyclists. *Scand J Med Sci Sports*. v.12, p.301-308, 2002b.
80. Sharpe, K., Hopkins, W. Emslie, R.R. et al., Development of reference ranges in elite athletes for markers of altered erythropoiesis. *Haematologica*. v.87, n.12, p.1248-57, 2002.
81. Shaskey, D.J., Green, G.A., Sports Hematology. *Sports Med*. v.29, n.1, p. 27-38, 2000.
82. Smith, L.L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? *Med Sci Sports Exerc*. v.32, n.2, p.317-331, 2000.

83. Smith, L.L. Tissue Trauma: The Underlying Cause of Overtraining Syndrome? *J. Strength Cond. Res.* v.18, n.1, p.184-191, 2004.
84. Smith, J.E., Garbutt, G., Lopes, P. et al. Effects of prolonged strenuous exercise (marathon running) on biochemical and hematological markers used in the investigation of patients in the emergency department. *Br J Sports Med.* v.38, p.292-294, 2004.
85. Smolka, M. B., Zoppi, C. C., Alves, A. A., et al. HSP72 as a complementary protection against oxidative stress induced by exercise in the soleus muscle of rats. *Am. J. Physiol.* v.279, n.R1539-R1545, 2000.
86. Snyder, A.C. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. *Med. Sci Sports Exerc.* v.30, n.7, p.1146-1150, 1998.
87. Solberg, H.E. International Federation of Clinical Chemistry and International. Approved recommendations (1986) on the theory of reference values. Part 5. *Clinica Chimica Acta.* v.170, S13-S32, 1987.
88. Solberg, H.E. The IFCC recommendations on estimation of reference intervals. The RefVal Program. *Clin Chem Lab Med.* v.42, n.7, p.710-714. 2004.
89. Stone, M.H., Keith, R.E., Kearney, J.T. et al. Overtraining: a review of the signs, symptoms and possible causes. *J. App. Sport Sci. Res.* v.5, p.35-50, 1991.
90. Suzuki, K., Totsuka, M., Nakaji, S. et al. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. *J. Appl. Physiol.* v.87, n.4, p.1360-7, 1999.
91. Telen J. M., O eritrócito maduro. IN: Lee, R.G. et al. Wintrobe Hematologia Clínica. 1.ed. São Paulo: Manole, 1998. Cap.5, p.103-138.
92. Tidball, J.G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.27, n.7, p.1022-1032, 1995.
93. Tiidus, P. M. Radical species in inflammation and overtraining. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v.76, p.533-538, 1998.
94. Toumi, H., Best, T. M., The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Medicine.* v.37, p.284-6, 2003.
95. Venkatraman, J.T., Leddy, J., Pendergast, D. Dietary fats and immune status in athletes: clinical implications. *Med. Sci. Sports Exerc.* v.32, n.7, p.S389-S395, 2000.
96. Welch, W. J. How cells respond to stress. *Scientific American.* v.268, n.5, p.34-41, 1993.

97. Yang, Z.W., Yang, S.H., Chen, L. et al. Comparison of blood counts in venous, fingertip and arterial blood and their measurement variation. *Clin. Lab. Haem.* v.23, p.155-159, 2001.
98. Zoppi, C.C., Antunes-Neto, J.M., Catanho, F.O. et al. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Rev. paul. Ed. Fís.* v.17, n.2, p.119-130, 2003.

COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS

Nunes, L.A.S. & Macedo D.V. (2005) Comparação de parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue de atletas obtido por microcoleta e punção venosa. XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Goiânia – GO.

Nunes, L.A.S. & Macedo, D.V. (2005) Comparison between biochemical and hematological analysis through capillary and venous blood puncture. XXXIV Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Águas de Lindóia – SP.

P.G. Gandra, L.A.S. Nunes, M.A. Passos, A.A. Alves, L.T. Kubota, D.V. Macedo.(2005) Blood Plasma and Saliva Antioxidant Capacity Changes in Young Male Basketball Players after 5 weeks of training. XXXIV Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Águas de Lindóia – SP.

Nunes, L.A.S. & Macedo, D.V. (2006) Determinação de valores de referência para parâmetros bioquímicos e hematológicos em indivíduos fisicamente ativos. XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Curitiba – PR.

Nunes, L.A.S., Gandra, P.G., Macedo, D.V. (2006) Relação da capacidade antioxidante total de soro e saliva em jogadores de futebol. XXXIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Curitiba – PR.