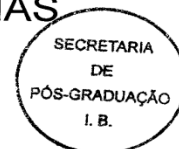


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LÁZARO ALESSANDRO SOARES NUNES

**“PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS NA
SALIVA E SANGUE DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE ATIVOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Lázaro Alessandro Soares Nunes
Nunes
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo

Campinas, 2011

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

N922p

Nunes, Lázaro Alessandro Soares
Parâmetros bioquímicos e hematológicos na saliva e
sangue de indivíduos fisicamente ativos / Lázaro
Alessandro Soares Nunes. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Denise Vaz de Macedo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Saliva. 2. Sangue. 3. Valores de referência. 4.
Teste de esforço. 5. Variação (Biologia). 6. Exercício. I.
Macedo, Denise Vaz de, 1959-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Biochemical and hematological parameters in saliva and blood from physically active subjects.

Palavras-chave em inglês: Saliva; Blood; Reference values; Exercise test; Variation (Biology); Exercise.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Denise Vaz de Macedo, Helena Zerlotti Wolf Grotto, Foued Salmen Espindola, José Camillo Novello, Verônica Salerno Pinto.

Data da defesa: 17/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 17 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

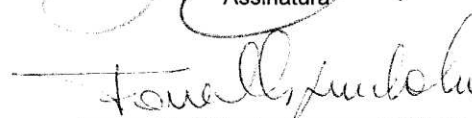
Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto


Assinatura

Prof. Dr. Foued Salmen Espindola


Assinatura

Profa. Dra. Verônica Salerno Pinto


Assinatura

Prof. Dr. Mauricio Yonamine


Assinatura

Prof. Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Prof. Dr. Edson Rosa Pimentel


Assinatura

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati


Assinatura

AGRADECIMENTOS:

À minha esposa e companheira Raquel, que viveu comigo intensamente os momentos desta caminhada.

À minha Orientadora Profa. Dra. Denise Vaz de Macedo, pelo incentivo e apoio em todos os momentos desta caminhada.

Ao Professor René Brenzikofer pela disponibilidade em discutir e agregar conhecimento científico aos artigos desta tese.

Aos meus pais, irmãos e toda a minha família que souberam compreender os momentos que precisei ficar distante.

A todos os meus colegas do Labex, pela oportunidade de conviver com pessoas sempre dispostas a compartilhar a amizade e o conhecimento científico.

Aos meus colegas professores, técnicos e funcionários da Metrocamp pela convivência que muito me engrandece como pessoa.

Ao CNPq pelo apoio e suporte financeiro durante o desenvolvimento desta tese de Doutorado.

A DEUS que sempre guia meus caminhos e me propicia momentos de alegria e realização como este.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1. MONITORANDO O PROCESSO DE TREINAMENTO ATRAVÉS DE BIOMARCADORES	15
Biomarcadores	15
Valores de referência.....	17
Estabelecimento de valores de referência segundo as normas da Federação Internacional de	
Química Clínica: a parceria entre Labex e Escola Preparatória de Cadetes do Exército (EsPCEX) .	19
Interpretação de resultados individuais provenientes de análises consecutivas: Diferença Crítica ou	
Reference Change Value (RCV)	20
2. OBJETIVOS GERAIS	25
CAPÍTULO 1	26
VALORES DE DIFERENÇA CRÍTICA PARA ANALITOS NO SANGUE DE	
INDIVÍDUOS FISICAMENTE ATIVOS	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	42
CAPÍTULO 2	47
DIFERENÇA CRÍTICA APLICADA AO MONITORAMENTO DE JOGADORES DE	
FUTEBOL.....	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT	51
INTRODUÇÃO	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	54
RESULTADOS.....	56
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÃO	64
CAPÍTULO 3	65
SALIVA COMO FLUÍDO DIAGNÓSTICO: REVISÃO SOBRE AS POTENCIALIDADES	
E LIMITAÇÕES DE UTILIZAÇÃO NO ESPORTE	66
RESUMO.....	67
ABSTRACT	68
1. INTRODUÇÃO	69
2. PRODUÇÃO DE SALIVA.....	70

3. FUNÇÕES E REGULAÇÃO.....	72
4. CONSTITUINTES DA SALIVA	74
4.1. PROTEÍNAS E ENZIMAS.....	74
4.2. COMPOSTOS INORGÂNICOS	78
4.3. COMPOSTOS ORGÂNICOS NÃO PROTEICOS	80
4.4. HORMÔNIOS	81
5. MÉTODOS DE COLETA DE SALIVA.....	84
6. INTERFERENTES PRÉ-ANALÍTICOS E ANALÍTICOS NAS ANÁLISES DE SALIVA	87
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
CAPÍTULO 4	91
INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA ANALITOS EM SALIVA DE INDIVÍDUOS FÍSICAMENTE ATIVOS.....	92
RESUMO.....	93
ABSTRACT	94
INTRODUÇÃO	95
MATERIAL E MÉTODOS.....	96
RESULTADOS.....	100
DISCUSSÃO	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXO 1	126
VARIAÇÃO BIOLÓGICA PARA ANALITOS QUANTIFICADOS NO SANGUE DE INDIVÍDUOS FÍSICAMENTE ATIVOS	126
ANEXO 2.....	133
PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS (CEP) FCM/UNICAMP.....	133
ANEXO 3.....	135
PUBLICAÇÕES, COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E EXPERIÊNCIA DOCENTE DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.....	135

RESUMO GERAL

A análise individual de parâmetros bioquímicos e hematológicos comparados com valores de referência populacionais pode ser uma ferramenta útil para monitorar os efeitos de treinos e competições, uma vez que a detecção de sujeitos com valores aumentados ou diminuídos em relação ao grupo de referência possibilita a individualização do programa de treinamento ou intervenção médica/nutricional quando necessária. No entanto, para que as informações obtidas sejam aplicáveis no dimensionamento das cargas de treino é necessário o estabelecimento de intervalos de referência (limites superiores e inferiores) para os analitos de interesse, de amostras de sangue obtidas de uma população fisicamente ativa e/ou atletas. Os valores utilizados normalmente na clínica são obtidos de sujeitos saudáveis, mas não praticantes de atividade física, embora seja consenso que o treinamento físico influencia a concentração de alguns analitos. Outro fato importante a considerar para o monitoramento do treino de atletas através de biomarcadores é a necessidade de comparação de resultados provenientes de análises consecutivas de um mesmo sujeito, que demanda considerar a variação analítica e biológica inerente aos testes, contidas nos cálculos da Diferença Crítica ou *Reference Change Value* (RCV) para cada analito. O RCV define o percentual de alteração que deve ser excedido em um teste subsequente para que exista uma diferença significativa entre duas medidas consecutivas. A necessidade de coleta de amostras de sangue venoso em diferentes momentos do ano para muitos indivíduos é um procedimento desconfortável e estressante. A saliva apresenta vantagens distintas como substituta do sangue no monitoramento de atletas, pois é um fluido não invasivo e que não requer treinamento especializado para sua coleta. A saliva é constituída de água, eletrólitos, metabólitos, proteínas, enzimas e hormônios, que podem ser provenientes do plasma ou produzidos localmente nas glândulas salivares. Portanto, nem todos os componentes salivares irão se correlacionar com os valores plasmáticos. Além disso, a composição da saliva pode sofrer influência do sistema nervoso autônomo, medicamentos e estresse. Dessa forma, a utilização da saliva deve considerar métodos de coleta que permitam quantificação de volume e recuperação acurada da amostra, além de horários de coleta definidos de acordo com o analito quantificado. Da mesma forma, é importante o estabelecimento de valores de referência para os analitos de escolha. Os objetivos da presente Tese de Doutorado foram: estabelecer intervalos de referência e de RCV para analitos no sangue de um grupo de indivíduos fisicamente ativos; verificar a aplicabilidade dos valores estabelecidos para o monitoramento de jogadores de futebol da categoria sub-20, apresentados na presente Tese na forma de Capítulos (1 e 2, respectivamente). Uma revisão crítica do potencial da saliva como biomarcador, apresentada no Capítulo 3, e a determinação de valores de referência de analitos de interesse no esporte na saliva coletada em um sistema de base líquida, que permite a determinação acurada do volume e recuperação da amostra, apresentada no Capítulo 4, compuseram os outros objetivos da presente Tese de Doutorado. Participaram dos estudos 171 voluntários do sexo masculino, com idade entre 18 e 20 anos após quatro meses de treinamento físico diário sistematizado (população referência controle). O programa de atividade física incluiu atividades predominantemente aeróbicas (maior

volume, menor intensidade) com duração diária de 3 horas. A coleta de saliva precedeu a coleta de sangue. Para a determinação do RCV foram realizadas 4 coletas mensais de sangue em 56 sujeitos. A aplicabilidade dos valores estabelecidos acima contou com a participação de 56 jogadores de futebol da categoria sub-20. Amostras de sangue foram coletadas mensalmente em 5 momentos ao longo da temporada de treinos e competição. Os resultados apresentados na presente tese de doutorado permitirão a aplicação destas análises no monitoramento de atletas durante treinos e competições.

ABSTRACT

Comparing individual biochemical and hematological parameters values with reference intervals obtained from a physically active population and/or athletes may be a useful tool to monitor the effects of training and competition, since to detect subjects with increased or decreased values compared to the reference group would allow individualizing training program or medical/ nutritional intervention when necessary. However, to the athletes blood results allowing relevant information to establishment of training loads, it's necessary to establish reference intervals (upper and lower limits) for different analytes in a physically active population. The generally adopted reference values are usually obtained from healthy subjects, but not physically active or athletes. The minimum recommended number (120 subjects) by the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) to establish reliable reference intervals can be one of those responsible for the lack of such information in sports medicine. Another fact to consider is that the athlete's monitoring through blood parameters requires serial analysis over the time. In this case, for the interpretation of serial results in the same subject it is proposed to consider the biological and analytical variation related to the analyte through the reference change value (RCV). RCV is a percent value that should be exceeded by a subsequent testing so that there is a significant difference between two consecutive measurements. However, to monitor athletes we need to collect venous blood at different times of the year, which for many individuals is an uncomfortable and stressful procedure. Saliva has distinct advantages as a substitute for blood in the athletes monitoring, it is a noninvasive fluid that do not requires specialized training for their collection. Saliva consists of water, electrolytes, metabolites, proteins, enzymes and hormones originated from plasma or locally produced in the salivary glands. Therefore, not all salivary components will be correlated with serum. Moreover, the composition of saliva may be influenced by the autonomic nervous system, drugs and stress. Thus, the correct saliva use should consider collection methods that allowing volume quantification and sample accurate recovery, collection schedules in according with the analyte and the establishment of specific salivary reference intervals. The objectives of this thesis were: to establish blood reference intervals and RCV to physically active population; to verify the applicability of RCV in the under-20 soccer players category monitoring (presented here in Chapters 1 and 2, respectively). A critical review of the potential saliva application in sports science, presented in the chapter 3, and the establishment of saliva reference intervals in a liquid based saliva collection system, which allow the accurate volume quantification and recovery, presented in the chapter 4, completed de aims of this Thesis. Participated in this study 171 physically active volunteers (control group), male, age (19 ± 1 years old). The regular physical activity program included periodized activities predominantly aerobic (higher volume, lower intensity) with three hours daily duration. The saliva was collected before the blood samples. To establish RCV were collected 4 monthly blood samples from 56 physically active subjects. The RCV were applied in the 56 soccer players from the under-20 category in 5 moments during the training and competition season. The results

presented in this PhD thesis will allow to monitor athletes during training and competition season.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O treinamento esportivo, de uma maneira geral, consiste na somatória de repetidas sessões de exercícios realizadas de forma sistematizada e numa sequência programada (periodizada), com o objetivo de gerar um processo adaptativo contínuo, relacionado diretamente com a síntese de proteínas. Para isso aplicam-se sobrecargas progressivas de esforço durante as sessões de treino, as quais provocam um distúrbio da homeostasia celular, a consequente resposta a esse estresse, e o restabelecimento do equilíbrio interno com níveis de atividade maiores quando comparados ao pré-treino.

Sobrecargas de esforço físico podem ser manipuladas através de variáveis como carga (intensidade, velocidade), duração, pausa entre estímulos, ação muscular, velocidade de execução do movimento, frequência dos exercícios/semana, número de sessões/dia, número de exercícios/sessão, amplitude dos movimentos e combinação dos exercícios na sessão. O efeito cumulativo de várias sessões de exercícios na expressão gênica leva a alterações fenotípicas do músculo e, consequentemente, a aumentos de rendimento em capacidades biomotoras diversas (Toigo & Boutellier, 2006).

Assume-se que os processos adaptativos que levam ao restabelecimento da homeostasia não cessam quando ela é atingida, mas superam o estado anterior, num processo denominado de *supercompensação*. Nesse estado adaptativo ocorre um melhor suprimento energético para exercícios que venham a requerer maior mobilização metabólica ou, ao contrário, uma economia de energia em atividades físicas que já eram habituais na estrutura do treino. Dessa forma, o melhor momento

para aumentar as cargas de exercícios durante uma periodização de treinamento seria no auge da supercompensação.

Para atingir a supercompensação é necessário que a razão entre sobrecargas de esforço e tempo de recuperação esteja individualmente equilibrada, uma vez que o reparo e regeneração das estruturas danificadas durante a aplicação do estímulo acontecem no repouso, quando ocorrem as respostas aos efeitos agudos do esforço físico. No entanto, individualizar para cada atleta o momento da supercompensação na rotina de treinamento ainda é pouco aplicável, pois nem sempre este momento pode ser facilmente identificado.

A prática de atividade física regular está associada com a diminuição no risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas e morte por problemas cardiovasculares (Lee, 2003). Este efeito protetor não é dependente apenas das alterações benéficas no perfil de lipídeos e lipoproteínas (Joyner & Green, 2009). A atividade física moderada também promove alterações no volume plasmático e células do sangue, que se traduzem em melhora no transporte de oxigênio para os tecidos (Sawka et al., 2000). Aumenta também a atividade do sistema imune, diminuindo assim a incidência de infecções (Gleeson, 2007).

O exercício físico também está associado com o aumento na produção de radicais livre e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), que desempenham papel importante na regulação de vias de sinalização celular necessárias para a adaptação do músculo esquelético ao treinamento (Powers et al., 2009).

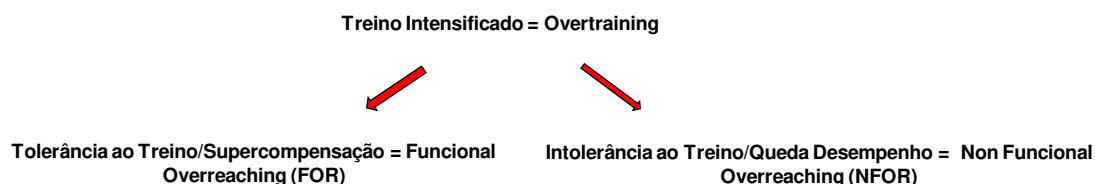
Por outro lado, quando o exercício é realizado de maneira intensa e excessiva, em alguns sujeitos pode ser muito prejudicial, tendo sido associado a lesões crônicas na musculatura e articulações, broncoconstrição, alterações comportamentais, e em casos mais raros a anafilaxia e morte súbita (Cooper et al., 2007).

O treinamento intensificado, também chamado de período de “choque” é comum no esporte de alto rendimento, uma vez que o aumento no desempenho previamente atingido pode ser extremamente significativo em um tempo reduzido de treinamento (1 a 3 semanas). Esse treino pode ser manipulado através de aumentos substanciais nas cargas, na duração, frequência, intensidade ou em mais de uma variável simultaneamente e, principalmente, pela redução do período regenerativo. Por outro lado, já está bem documentado que para alguns sujeitos essa intervenção pode induzir intolerância ao treino, caracterizada pela perda do nível de desempenho anteriormente atingido (Halsen & Jenkendorp, 2004; Coutts et al., 2007).

Ao longo dos anos foram utilizadas diferentes nomenclaturas para descrever essa perda do desempenho em indivíduos previamente bem adaptados. Entre elas encontramos: *overtraining*, *overtraining syndrome*, *overreaching*, *non functional overreaching (NFOR)*, *staleness*, *chronic fatigue* (Urhausen & Kindermann, 2002; Meeusen et al., 2006). Independente da nomenclatura utilizada, a intolerância ao treino gera prejuízos, financeiro e emocional para empregadores/patrocinadores, treinadores, atletas e torcida.

Nosso grupo de pesquisa adota a posição tirada em 2006 pelo Colégio Europeu de Ciência do Esporte (Meeusen et al., 2006), que denominou um período de

treinamento intensificado de *overtraining* (OT), e os possíveis estados adaptado e “mal adaptado” subsequentes ao OT de estados FOR (*Funcional Overreaching*) e NFOR (*Non funcional overreaching*), respectivamente:



O estado FOR representa a condição de manutenção ou eventual melhora no desempenho (supercompensação). Já o estado NFOR representa o estado de queda no desempenho de forma prolongada (intolerância ao treino). O estado NFOR pode ainda evoluir para a síndrome do *overtraining* (OTS), caracterizada por alterações metabólicas, fisiológicas e psicológicas mais acentuadas que no estado NFOR, com queda de desempenho por um período ainda mais prolongado (Petibois et al., 2002; Halson & Jenkendrup, 2004; Coutts et al., 2007).

Atletas de rendimento são mais susceptíveis ao estado NFOR, uma vez que para a obtenção e manutenção de níveis de desempenho físico adequados durante os vários campeonatos que compõe o calendário anual competitivo, são submetidos constantemente a períodos de OT (Kenttä et al., 2001). Por outro lado, o tempo para a recuperação entre um estímulo e outro muitas vezes também é ignorado pelos atletas amadores. Muitos deles participam, por exemplo, de corridas de rua praticamente todo final de semana, sem dar importância para a recuperação do estresse induzido pela própria competição. Na tentativa de acompanhar os treinamentos prescritos para os

principais campeões mundiais, principalmente no quesito quantidade de estímulo/recuperação, o corredor pode experimentar uma queda de desempenho. A falta de conhecimento leva muitas vezes a continuidade dos treinos, produzindo graves quadros de lesões crônicas por esforço (mialgias, tendinites e/ou fraturas por estresse).

A investigação das relações entre estados adaptado, FOR e NFOR que ocorrem em resposta ao treinamento físico constitui a linha de pesquisa principal do Laboratório de Bioquímica do Exercício (Labex). Acreditamos que o monitoramento de atletas em treinamento através de biomarcadores sanguíneos e/ou salivares associados a diferentes testes físicos pode ser uma ferramenta útil na tentativa de prevenir a instalação dos estados NFOR e OTS.

1.1. Monitorando o processo de treinamento através de biomarcadores

Biomarcadores

A atividade física de diferentes tipos e intensidades pode influenciar as concentrações séricas de muitos analitos (Sawka et al., 2000; Lac & Maso, 2004; Lazarim et al., 2009, Nunes et al. 2010). A literatura sugere pequenas diferenças clínicas na função imune de indivíduos fisicamente ativos quando comparados aos sedentários (Gleeson, 2007). Além disso, o treinamento físico pode melhorar o transporte de oxigênio aos tecidos, fazendo com que o hemograma se torne útil na avaliação do atleta durante treinos e competições. O hemograma também é útil no monitoramento e diagnóstico de anemias em atletas, principalmente aquelas inerentes à modalidade praticada (Sottas et al., 2010, Schumacher et al. 2002).

Além do hemograma, a concentração de alguns metabólitos e atividade de enzimas musculares podem fornecer informações importantes para a prevenção de lesões nos atletas (Lazarim et al. 2009). A uréia é o produto final de degradação do nitrogênio originário das proteínas, ela é sintetizada no fígado e excretada por via renal. Os principais fatores que influenciam o aumento das concentrações séricas de uréia durante o período de treinos são: aumento do *turnover* proteico, redução na ingestão de água e reposição inadequada de glicogênio (Hartmann & Mester, 2000). A concentração sérica de creatinina é amplamente aceita como marcador de função renal na clínica médica (Perrone et al., 2002). O exercício agudo pode provocar alterações na taxa de filtração glomerular que se refletem nos níveis séricos de creatinina em atletas. A creatinina pode sofrer ainda variações de acordo com a massa muscular do indivíduo e modalidade praticada (Banfi & Del Fabro, 2006). O ácido úrico é produto final de degradação das purinas, ele representa o principal antioxidante presente em fluídos como sangue e saliva (Lippi et al., 2008), sua quantificação é útil no monitoramento da capacidade antioxidante de atletas em treinamento (Carlsohn et al., 2008).

A atividade plasmática da enzima creatina quinase (CK) e aspartato amino transferase (AST) são importantes marcadores de sobrecarga de treino (Lazarim et al., 2009), que associados à proteínas de fase inflamatória aguda (proteína C-reativa e alga-1-glicoproteína ácida) podem ser utilizados para monitorar e prevenir o dano muscular induzido pelo exercício (Fatouros et al., 2010).

A interpretação correta dos resultados de biomarcadores mensurados em atletas demanda a comparação do resultado obtido a um valor de referência populacional ou com resultados prévios do mesmo indivíduo (diferença crítica) (Fraser, 2001).

Entretanto é importante que tanto valores de referência como diferença crítica sejam obtidos de população fisicamente ativa.

Valores de referência

A análise individual de parâmetros bioquímicos e hematológicos comparados com valores de referência obtidos de uma população fisicamente ativa e/ou atletas pode ser uma ferramenta útil para monitorar os efeitos dos treinos (Ispirlidis et al., 2008). A detecção de sujeitos com valores aumentados ou diminuídos em relação ao grupo de referência permitiria a individualização do programa de treinamento ou intervenção médica/nutricional quando necessário.

Os diferentes tipos de treino podem ocasionar respostas metabólicas distintas para cada analito. Foi mostrado que atletas de endurance têm menores valores de hematócrito e hemoglobina em relação aos praticantes de treinamento de força (Schumacher et al., 2002). Os valores séricos de creatinina, por exemplo, podem variar de acordo com a modalidade praticada (Lippi et al., 2004; Banfi & Del Fabro, 2006), provocando assim a necessidade de subdivisão de intervalos de referência de acordo com a modalidade. É importante considerar ainda que além dos efeitos do treinamento, os parâmetros bioquímicos e hematológicos podem sofrer influência de idade, etnia, sexo, dieta, ciclo circadiano e variabilidade analítica (Ritchie & Palomaki, 2004).

Os valores de referência rotineiramente utilizados pelos laboratórios de patologia clínica normalmente são obtidos de sujeitos saudáveis, mas não fisicamente ativos ou atletas. Dessa forma, para que o monitoramento sanguíneo de atletas traga informações aplicáveis no dimensionamento das cargas de treino é necessário o estabelecimento de intervalos de referência (limites superiores e inferiores) para os

diversos analitos obtidos de uma população fisicamente ativa (praticantes de atividade física regular e periodizada) ou atletas.

A Figura 1 mostra o procedimento recomendado para o estabelecimento de intervalos de referência para um determinado analito segundo as normas da Federação Internacional de Química Clínica (FIQC).

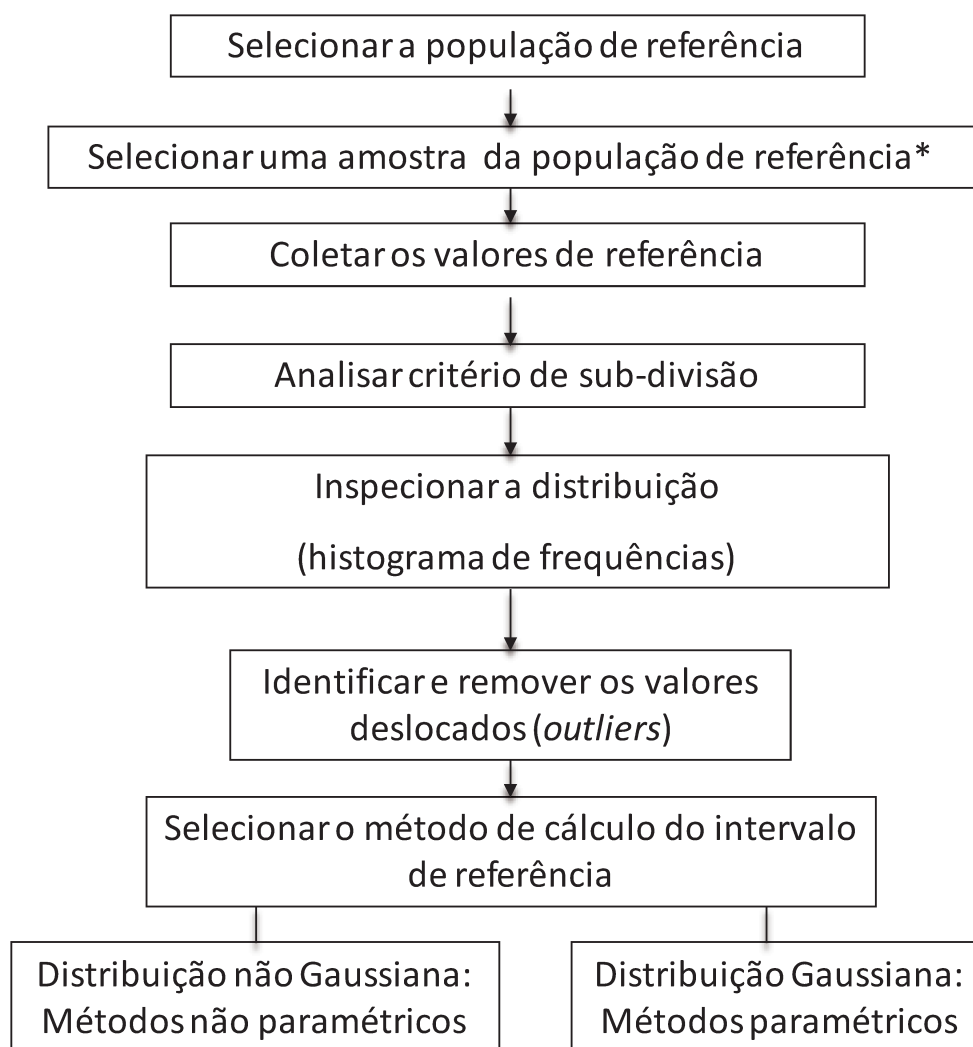


Figura 1. Algoritmo para estimar intervalos de referência de acordo com as normas da Federação Internacional de Química Clínica (Adaptado de Solberg, 1987). *número mínimo = 120 indivíduos.

O protocolo rigoroso proposto pela FIQC pode ser uma das causas da escassez de intervalos de referência válidos para aplicação no esporte. O número mínimo de 120 sujeitos preconizado pela FIQC para o estabelecimento de intervalos de referência (Horn et al., 2003) é outra dificuldade encontrada. A necessidade de controle rigoroso das fases pré-analíticas e analíticas também dificulta a realização destes estudos (Fraser, 2001).

Estabelecimento de valores de referência segundo as normas da Federação Internacional de Química Clínica: a parceria entre Labex e Escola Preparatória de Cadetes do Exército (EsPCEEx)

A parceria entre o Labex e a Escola Preparatória de Cadetes do Exército (EsPCEEx) de Campinas envolve o estabelecimento de valores de referência e de RCV de amostra de sangue e saliva dos alunos em preparação para a carreira militar, que serão utilizadas como valores de referência de pessoas fisicamente ativas ($n=500$, idade= 19 ± 1 anos).

Os alunos são representativos de todas as regiões do País, e passam um ano na EsPCEEx para concluir o último ano do ensino médio antes de ingressarem para cursar a carreira militar na Academia Militar de Agulhas Negras (AMAN). Todos os sujeitos possuem o mesmo horário de acordar, estudar, dormir e realizar atividades físicas (3 horas diárias) e recebem a mesma alimentação. Para o ingresso na AMAN é

necessário, além da conclusão do ensino médio, uma pontuação mínima em três testes de aptidão física (TAF) padrão do exército que são realizados ao longo do ano.

Para isso os cadetes são submetidos a uma rotina de treinamento diário sistematizado, caracterizando uma amostra populacional perfeita para estabelecimento de valores de referência de sujeitos fisicamente ativos. Já nas primeiras semanas de estadia na EsPCEEx cerca de 100 alunos são selecionados para participar do grupo de atletas de diversas modalidades esportivas, que competem pela EsPCEEx na Olimpíada anual entre Exército, Marinha e Aeronáutica. Os alunos selecionados como atletas são submetidos a treinos adicionais específicos da modalidade.

Outros pesquisadores do Labex aplicam diferentes testes físicos em três momentos do ano: antes do início e após 4 e 8 meses de treino. Através de um aplicativo matemático desenvolvido para identificação ágil de sujeitos com respostas diferenciadas mesmo em um grupo grande como esse, é possível coletar amostras de sangue somente dos sujeitos que exibem desempenho aumentado após quatro meses de treino diário e sistematizado quando comparado com os resultados obtidos anteriormente, no ingresso na Escola. Isso permite um alto rigor metodológico para o estabelecimento de Valores de Referência.

Interpretação de resultados individuais provenientes de análises

consecutivas: Diferença Crítica ou *Reference Change Value* (RCV)

O monitoramento de atletas através de biomarcadores sanguíneos demanda várias análises de sangue ao longo do ano. Nesse caso, para que a interpretação dos resultados provenientes de análises consecutivas de um mesmo sujeito ofereça maior sensibilidade, propõe-se considerar a variação analítica e biológica inerente ao teste,

que estão contidas nos cálculos da Diferença Crítica ou *Reference Change Value* (RCV) para cada analito (Harris & Yasaka, 1983). O RCV define o percentual de alteração que deve ser excedido em um teste subsequente para que exista uma diferença significativa entre duas medidas consecutivas.

A comparação com o RCV é importante porque a concentração de um analito pode oscilar de forma individual para cada paciente/pessoa ao longo do tempo. Em condições estáveis esta variação geralmente apresenta uma distribuição Gaussiana (Ricos et al., 2004). O cálculo da média e desvio padrão desta oscilação individual nos permite conhecer a variação biológica intraindividual (VB_I). Para facilitar a comparação dos analitos entre indivíduos o coeficiente de variação biológico intraindividual ($CV_I\%$) é calculado ($CV_I \% = \text{desvio padrão}/\text{média} \times 100$). Outro componente importante é a variação biológica entre sujeitos, que através da média e desvio padrão de resultados de diferentes indivíduos, nos permite estimar o coeficiente de variação entre sujeitos (CV_G). Tanto o CV_I quanto o CV_G podem ser estimados ou compilados de bancos de dados disponíveis para vários analitos (Ricos et al., 1999).

A razão entre CV_I e CV_G é chamada de índice de individualidade (II), quanto menor o II maior a individualidade inerente do analito testado (Harris, 1974; Fraser, 2004; Ricos et al., 2004), de maneira geral quando o $II > 1,4$ a comparação do resultado de um exame laboratorial com valores obtidos de população de referência é favorecida, porém quando o $II < 0,6$ a utilização do RCV traz mais benefícios em detectar alterações significativas (Fraser, 2004; Ricos et al., 2004).

Além da variação biológica, a variação pré-analítica e analítica também pode influenciar nos resultados obtidos. A variação pré-analítica pode ser minimizada através

da adoção de instruções padronizadas aos sujeitos antes da coleta, e protocolos escritos para realização da coleta, transporte e processamento das amostras (Guder et al., 2003).

Os métodos de calibração e controle são críticos para garantir a acurácia dos resultados. A variação analítica pode ser estimada através do cálculo do coeficiente de variação analítica (CV_A), obtido através da média e desvio padrão dos resultados do controle interno da qualidade. A variação analítica pode ser reduzida através da correta manutenção do equipamento e monitorada com a utilização de amostras controle. O protocolo do controle interno da qualidade (CIQ) deve incluir a análise de amostras controle que simulem a matriz empregada nos valores de referência (Westgard, 2004). A análise estatística dos resultados do controle pode ser realizada através da elaboração do gráfico de Levey-Jennings para cada analito e aplicação das regras múltiplas de Westgard, neste caso é necessário utilizar no mínimo dois níveis de concentração diferentes para o CIQ (Westgard, 2003).

Além disso, é importante estabelecer os critérios de especificação da qualidade analítica a serem adotados como metas do desempenho. Dentre os modelos propostos na literatura, a especificação da qualidade analítica baseada na variação biológica é amplamente aceita e apresenta algumas vantagens tais como: facilidade de aplicação a todos os laboratórios, independente do porte, localização e tipo, além de possuírem metas de imprecisão e bias concretamente definidos para mais de 180 analitos (Fraser and Petersen, 1999). Neste modelo, a imprecisão dos ensaios pode obedecer três níveis de desempenho de acordo com os valores de CV_I . Desempenho mínimo ($CV_A <$

$0,75 \times CV_I$), desempenho desejável ($CV_A < 0,50 \times CV_I$) e desempenho ótimo ($CV_A < 0,25 \times CV_I$) (Fraser and Petersen, 1999).

A determinação dos valores de RCV para sujeitos fisicamente ativos pode aumentar a sensibilidade/especificidade das análises bioquímicas como marcadoras dos efeitos do treino, permitindo uma análise mais aprofundada e individualizada. O RCV permite avaliar a mudança unidirecional (apenas aumento ou diminuição significativa do resultado) ou bidirecional (aumento e diminuição significativa do resultado).

Nos últimos anos aumenta a preocupação de pesquisadores da área da ciência do esporte em monitorar analitos no sangue, a fim de prevenir os estados NFOR e OTS (Meeusen et al., 2006). No entanto, ainda são escassos na literatura estudos realizados com indivíduos praticantes de atividade física regular ou atletas que considerem a variação biológica (Bagger et al., 2003), sendo que na maioria das vezes o componente de variação analítico também é negligenciado.

Recentemente a União Internacional de Ciclismo (UCI) e a Agência Mundial Anti Doping (WADA) introduziram a obrigatoriedade do *passaporte biológico do atleta* (Sottas et al., 2009). Trata-se de uma forma indireta de detectar o uso de eritropoietina recombinante ou transfusão de sangue como doping, através da avaliação individualizada da variação biológica de vários parâmetros hematológicos (Robinson et al., 2007). Os valores de RCV, estabelecidos de um grupo de sujeitos fisicamente ativos permitiria detectar esta modalidade de doping através da avaliação do hemograma do atleta em análises seriadas ao longo da temporada.

Entretanto, a necessidade de obtenção de várias amostras de sangue venoso em diferentes momentos do ano é um procedimento desconfortável e incômodo para muitos atletas (Nunes et al., 2006). Neste contexto, a saliva parece ser uma alternativa interessante como substituta do sangue no diagnóstico e monitoramento de diferentes estados metabólicos. Pode ser coletada de forma não invasiva, através de um manejo muito mais seguro e sem a necessidade de profissional habilitado (Kaufman & Lamster, 2002), exercendo grande atrativo como fluído para monitoramento de tolerância ao treino. Entretanto é importante considerar a necessidade do estabelecimento de intervalos de referência específicos para os analitos em saliva derivados de população de referência fisicamente ativa ou atletas.

2. OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos da presente Tese de Doutorado foram: estabelecer intervalos de referência e de RCV para analitos no sangue, utilizando como população de referência o grupo de alunos da EsPCEEx (Capítulo 1); e verificar a aplicabilidade do RCV e Intervalos de referência previamente estabelecidos no monitoramento de jogadores de futebol da categoria sub-20 ao longo de 4 meses de treinos e competições (Capítulo 2).

Outros objetivos da presente Tese foram fazer uma revisão sobre o potencial da saliva como fluído diagnóstico (Capítulo 3); e testar um sistema de coleta de saliva em base líquida para a quantificação de alguns analitos de interesse no esporte, e estabelecer valores de referência para esses analitos em amostras de saliva (Capítulo 4).

CAPÍTULO 1

VALORES DE DIFERENÇA CRÍTICA PARA ANALITOS NO SANGUE DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE ATIVOS

Versão em português do artigo: Nunes, LAS, Brenzikofer, R, Macedo, DV.

REFERENCE CHANGE VALUES OF BLOOD ANALYTES FROM PHYSICALLY ACTIVE SUBJECTS, publicado no periódico: *Eur J Appl Physiol* 2010;110(1):191-8.

Valores de diferença crítica para analitos no sangue de indivíduos fisicamente ativos

Lazaro Alessandro S. Nunes¹, René Brenzikofer², Denise Vaz de Macedo¹

1. 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.

2. Laboratório de Instrumentação para Biomecânica – Faculdade de Educação Física, Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

A análise de constituintes sanguíneos permite a detecção de vários estados patológicos ou fisiológicos quando seus valores estão aumentados ou diminuídos em relação a um grupo de referência ou em comparação ao próprio indivíduo, se monitorado longitudinalmente. Nesse caso, é importante conhecer os valores de diferença crítica ou *reference change value* (RCV), que define o percentual de mudança que deve ser excedido para que uma alteração seja significativa levando-se em consideração a variação analítica e biológica inerentes aos testes. O objetivo deste estudo foi calcular a variação biológica e o RCV para algumas análises sanguíneas utilizadas no monitoramento de atletas. Foram coletadas amostras mensais de sangue total em EDTAK3 e Tubo com gel separador Vacuette® de 56 sujeitos (sexo masculino, 17 - 19 anos), ao longo de quatro meses de treinamento aeróbico periodizado. As análises bioquímicas (creatina kinase - CK, uréia, ácido úrico, proteína C-reativa - PCR, alfa-1-glicoproteína ácida, colesterol e triglicérides) foram realizadas em soro no aparelho Autolab Boehringer e o hemograma no aparelho KX-21N SYSMEX®. Os valores de RCV para leucócitos e todos os parâmetros bioquímicos apresentaram valores mais elevados em comparação com indivíduos sedentários. Por outro lado, o RCV para a série vermelha apresentou valores menores em indivíduos fisicamente ativos em comparação aos sedentários. O estabelecimento de valores de RCV em indivíduos fisicamente ativos aumenta a sensibilidade/especificidade na detecção de alterações bioquímicas e hematológicas induzidas pelo treinamento ou a utilização de eritropoietina recombinante através de análises sanguíneas, particularmente em casos de monitoramento longitudinal.

Palavras chave: Variação biológica, treinamento, exercício, índice de individualidade.

ABSTRACT

The analysis of blood constituents allows for the detection of various physiological or pathological states when their values are increased or decreased in relation to a well-defined reference group or to themselves if monitored longitudinally. In the latter case, it is important to know the Reference Change Value (RCV) or Critical Difference, which defines the percentage change that should be exceeded—given the analytical and biological variations inherent to a particular test, in that there is a significant difference between the two consecutive measurements. Our objective was to calculate the biological variation, the analytical variation and the RCV of biochemical and hematological parameters in subjects undergoing four months of regular aerobic training. Blood samples (10mL) were collected monthly from 56 male subjects (17-20 years old). Creatine kinase and aspartate aminotransferase activities, total cholesterol, triglycerides, uric acid, C-reactive protein, alpha-1-acid glycoprotein, creatinine and urea concentrations were measured in sera using an Autolab Boehringer analyzer. Hemogram were obtained from total blood using KX-21N SYSMEX® equipment. The RCV values for leukocytes and all biochemical analytes were elevated when compared with the literature values of sedentary subjects. On the other hand, the RCV values for red blood cell count were slightly lower in physically active than in sedentary individuals. Knowledge of analyte RCV values within physically active subjects should improve the sensitivity/specificity of the hematological and biochemical alterations induced by training or by the use of recombinant form of erythropoietin through blood parameter analysis, particularly in cases of longitudinal monitoring.

Keywords: Critical difference, training, exercise, biological variation, index of individuality.

INTRODUÇÃO

Comparar resultados de parâmetros sanguíneos com intervalos de referência obtidos de população definida, além de diagnosticar diversas patologias, pode ser útil no monitoramento de efeitos adaptativos do treinamento. Esta ferramenta pode ser utilizada, por exemplo, para programas ou intervenções médico/nutricionais quando necessário. Entretanto, esta forma de análise comparativa tem certas limitações, uma vez que os resultados laboratoriais podem ser influenciados pelas oscilações naturais particulares a cada analito, também conhecidas como variação biológica (Fraser, 2004). A variação biológica pode dificultar a interpretação dos resultados clínicos, particularmente quando as análises são realizadas de forma consecutiva no mesmo indivíduo.

Uma ferramenta utilizada para verificar se a diferença entre duas análises consecutivas é significativa e biologicamente relevante é o cálculo da diferença crítica ou *reference change value* (RCV), que leva em consideração os vários componentes de variação intrínseca que afetam os testes laboratoriais. Eles incluem fatores relacionados à atividade laboratorial (variação pré-analítica e variação analítica) e aqueles que são relacionados à variação biológica intra-individual (Omar et al., 2008). Assim, o RCV define um percentual de alteração que deve ser excedido, quando consideramos a variação biológica e analítica inerente aos testes, para que exista diferença significativa entre duas medidas consecutivas.

A variação intra-individual, um dos componentes da variação biológica, é geralmente expressa como coeficiente de variação intra-individual (CV_i). Este

coeficiente reflete a variação aleatória temporal de um analito durante a homeostase, e geralmente apresenta distribuição Gaussiana (Ricós et al., 2004; Iglesias et al., 2005). Outro componente da variação biológica é a variação entre sujeitos (CV_G), ou variação do grupo. Ambos CV_I e CV_G são influenciados por idade, sexo, peso, dieta, ciclo circadiano, patologias e atividade física (Ricós et al., 2004).

A maioria dos analitos que são quantificados no laboratório clínico tem $CV_I < CV_G$. Neste caso, a comparação de um resultado individual com um intervalo de referência pode não ser tão útil, porque alguns indivíduos podem apresentar alterações significativas em resultados seriados que estão dentro dos limites normais de uma população de referência (Petersen et al., 1999). A análise de amostras consecutivas pela comparação com população de referência é útil principalmente quando $CV_I > CV_G$ (Fraser, 2004).

A razão obtida entre CV_I e CV_G é chamada de índice de individualidade (II). Em situações onde o II é baixo, o RCV é o método mais adequado para a interpretação de resultados, pois estes analitos requerem alterações individuais muito extensas para serem detectadas através de intervalos de referência populacionais (Harris, 1974; Fraser, 2004; Ricós et al., 2004).

De maneira geral, um II $< 0,6$ indica que o intervalo de referência pode ser substituído pelo RCV de maneira mais satisfatória. Outra solução para diminuir a variação natural particular a cada analito seria estratificar os intervalos de referência em várias categorias (idade, sexo, raça, ocupação, etc.) (Fraser, 2004).

Alguns pesquisadores tem se dedicado a estimar os componentes de variação biológica para as diferentes análises laboratoriais. Já existe um grande banco de dados

com os valores de variação biológica, e também valores de RCV para estes analitos em indivíduos saudáveis mas não fisicamente ativos (Costongs et al., 1985; Dot et al., 1992; Macy et al., 1997; Ricós et al., 1999; Ricós et al., 2004; Talwar et al., 2005; Wu et al., 2009a), ou com determinadas patologias (Ricós et al., 2007). Nosso objetivo neste estudo foi estabelecer a variação biológica e RCV para alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos em indivíduos submetidos a quatro meses de atividade física regular e periodizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos

Participaram deste estudo cinquenta e seis voluntários, com a idade de 18 ± 1 anos, todos no primeiro estágio de preparação escolar e física para o ingresso na carreira militar do Exército. Os sujeitos voluntários tomaram conhecimento da pesquisa previamente, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (CAAE: 0200.0.146.000-08). 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 ou lesionados foram excluídos da pesquisa. Todos os sujeitos no início do estudo não eram completamente sedentários, e participaram durante período de quatro meses de programa de atividade física regular e periodizada que incluía atividades predominantemente aeróbias (maior volume, menor intensidade), tais como corrida e natação, com duração diária de três horas, cinco dias na semana, com dois dias de repouso. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com Humanos da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/Unicamp.

Coleta de Amostras de Sangue

Todos os sujeitos foram avaliados longitudinalmente através de quatro coletas de sangue mensais (C_1 , C_2 , C_3 e C_4). Todas as coletas de sangue foram realizadas após 2 dias sem qualquer atividade física para evitar efeitos de hemodiluições agudas induzidas pelo exercício (Sawka et al.,2000). As amostras de sangue foram coletadas sob condições padronizadas: 2,0 mL de sangue venoso total em tubos a vácuo contendo EDTA/ K_3 para a determinação dos parâmetros hematológicos e 8,0 mL de

sangue venoso em tubos com gel separador Vacuette® (Greiner Bio-one) com gel separador para obtenção do soro utilizado nas dosagens bioquímicas. O sangue foi coletado após jejum de 12 horas no período da manhã, transportado em temperatura de 4°C para o laboratório dentro de 30 minutos, centrifugado sob-refrigeração a 1800xg por 10 minutos, imediatamente separado e protegido da luz.

Análises Sanguíneas

As análises hematológicas foram realizadas no aparelho KX-21N Sysmex® e incluíram: contagem de hemácias (RBC), concentração de 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 (Linf), neutrófilos (Neut) e contagem de plaquetas (PLT). As dosagens bioquímicas foram realizadas com kits comerciais (Wiener Lab Rosário Argentina) no aparelho Autolab Boehringer e incluíram: atividade da creatina quinase (CK) e aspartato amino transferase (AST), e concentração de colesterol total (CT), ácido úrico (AU), proteína C-reativa (PCR), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), creatinina (Cr), triglicérides (TG) e uréia. Para minimizar as variações analíticas todas as amostras foram ensaiadas sem alteração de lote para reagentes, padrões e materiais de controle e realizadas pelo mesmo analista.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com a utilização dos programas Matlab 7.0 e Graph Pad InStat3. Para estimar os componentes de variação biológica confiáveis é necessário seguir rigorosos protocolos e critérios de seleção pré-

estabelecidos: A condição dos voluntários deve ser estável, critérios de exclusão definidos devem ser aplicados, os dados obtidos devem ser estatisticamente analisados para detectar a presença de outliers e homogeneidade da amostra, e a variabilidade do sistema analítico deve ser minimizada e monitorada durante os testes (Fraser & Harris, 1989; Ricós et al., 2007). O coeficiente de variação intra-individual inclui componentes da variação analítica, portanto, é essencial obter resultados separados para os componentes de variação biológica e analítica (Fraser & Harris, 1989).

O coeficiente de variação analítico (CV_A) foi calculado através da média e desvio padrão obtido na análise do soro e sangue controle, que foi dosado no início e fim de cada corrida analítica. O desempenho analítico desejável foi estabelecido pelo $CV_A < 0,5 \times CV_I$ (Fraser et al., 1997; Fraser & Petersen, 1999). Todas as análises foram realizadas no mesmo dia de coleta das amostras.

Os *outliers* foram determinados entre as variâncias das análises de cada sujeito através do teste de Cochran (Zar, 1999), e também comparando a média do sujeito em relação aos valores do grupo seguindo o critério estabelecido por Reed (Fraser, 1989). Quando um *outlier* era detectado os valores dos quatro resultados do sujeito eram excluídos para a referida análise. A atividade da CK apresentou distribuição de valores levemente distorcida à direita, optamos pela transformação em logaritmo natural (Wu et al., 2009b) que permitiu a exclusão de apenas cinco sujeitos com valores individuais acima do intervalo de referência (Lazarim et al., 2009).

A homogeneidade de variâncias foi verificada através do Cochran teste com a utilização de função específica para o programa Matlab 7.0, proposta por Trujillo-Ortiz &

Hernandez-Walls (2003). Após a exclusão de outliers, os dados foram analisados para estimar o CV_I e CV_G .

Para cada analito, foi estimado o coeficiente de variação intra-indivíduo (CV_i) através do cálculo $\sigma/\mu*100$, onde: μ denota a média dos resultados do indivíduo nos quatro momentos (C_1 a C_4) e σ denota o desvio padrão das quatro análises. Como o CV_i calculado inclui um componente analítico, a fórmula de Fraser foi aplicada em cada um dos 56 sujeitos para remover a variação analítica (CV_A) de CV_i usando a fórmula:

$CV_{ib} = \sqrt{(CV_i^2 - CV_A^2)}$ (Fraser & Harris, 1989), onde CV_{ib} denota a CV_i sem a variação analítica. O coeficiente de variação intra-individual total (CV_I) foi aplicado na fórmula de cálculo do RCV usando-se a média global de CV_{ib} .

O coeficiente de variação entre indivíduos (CV_G) foi calculado a partir da média e desvio padrão das análises obtidas entre os participantes.

O cálculo do RCV foi baseado na seguinte fórmula:

$RCV = 2^{1/2} * Z_p * (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$, onde $2^{1/2}$ denota a probabilidade de mudança bidirecional e Z_p denota o desvio padrão correspondente ao nível de significância estatística (1,96 = 95% e 2,58 = 99%) (Harris & Yasaka, 1983; Fraser & Harris, 1989; Ricós et al., 2004).

O programa RefVal (Solberg, 2004), que inclui as fórmulas recomendadas pela Federação Internacional Química Clínica (FICQ), foi usado para calcular os percentis 2,5 e 97,5 do intervalo de referência das análises bioquímicas e hematológicas obtidas de 300 outros voluntários da mesma faixa etária após 4 meses de atividade física diária e periodizada.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as análises realizadas, os outliers removidos e valores de média e mediana da população estudada.

Tabela 1. Analitos quantificados (hematológicos e bioquímicos), outliers removidos, média e mediana calculadas a partir do número inicial de sujeitos.

Analito	Número inicial de sujeitos	Outliers removidos	Número final de sujeitos	Amostras	Média	Mediana
RBC ($10^{12}/L$)	56	2	54	216	4,89	4,90
Hb (g/dL)	56	0	56	224	14,5	14,6
Ht (%)	56	0	56	224	46,6	43,6
VCM (fL)	56	2	54	216	89	88,6
HCM (pg)	56	0	56	224	29,7	29,9
MCHC (g/L)	56	0	56	224	33,4	33,3
RDW (%)	56	4	52	208	12,7	12,7
WBC ($10^9/L$)	56	1	55	220	7,2	7,0
Neut ($10^9/L$)	56	4	52	208	4,1	3,9
Linf ($10^9/L$)s	56	0	56	224	2,2	2,1
PLT ($10^9/L$)	56	2	54	216	219	207
CK (U/L)	56	5	51	204	400	316
CT (mmol/L)	56	0	56	224	3,8	3,7
AU (mmol/L)	56	1	55	220	0,4	0,4
PCR (mg/L)	56	8	48	192	3,0	2,6
Cr ($\mu\text{mol/L}$)	56	0	56	224	102,5	101,6
TG (mmol/L)	56	8	48	192	0,8	0,7
Urea (mmol/L)	56	0	56	224	10,6	10,3

Não foi possível estimar a variação biológica para AST e AGP porque as variâncias das amostras apresentaram heterogeneidade mesmo após a exclusão dos *outliers* (Zar, 1999). A falta de homogeneidade nos dados pode ocasionar cálculos equivocados de variação biológica e falsas interpretações de resultados. Tais cálculos

envolvem análise de médias, e podem incorporar indivíduos com valores de CV_I que são muito maiores ou menores que aqueles do grupo (Fraser, 2001).

A Tabela 2 mostra os componentes de variação biológica (CV_A , CV_I e CV_G) e valores de RCV obtidos neste estudo em comparação com outros estudos realizados em indivíduos saudáveis não praticantes de atividade física regular.

Os valores de CV_I e RCVs para as células vermelhas e contagem de plaquetas foram levemente menores que os valores previamente relatados na literatura. Por outro lado, o exercício influenciou os valores CV_I dos leucócitos e todos os parâmetros bioquímicos. Os RCVs foram sempre maiores nos indivíduos fisicamente ativos que nos indivíduos sedentários, com as maiores diferenças na CK e PCR.

Tabela 2 – Componentes de variação biológica e coeficientes de variação analítica com valores de RCV para parâmetros bioquímicos e hematológicos em indivíduos fisicamente ativos comparados à população saudável não exercitada.

Analito	Sujeitos fisicamente ativos					População saudável não exercitada		
	CV _A (%)	CV _I (%)	CV _G (%)	II	RCV ₉₅ % (%)	CV _I (%)	CV _G (%)	RCV ₉₅ % (%)
RBC	0,50	2,9	6,3	0,46	8,3	3,0 (Dot et al., 1992)	6,1 (Ricós et al., 1999)	9,9 (Ricós et al., 2004)
Hb	1,0	2,7	5,6	0,48	8,0	2,8 (Dot et al., 1992)	6,8 (Fraser et al., 1989)	8,7 (Ricós et al., 2004)
Ht	0,7	2,8	5,2	0,50	8,0	2,9 (Dot et al., 1992)	6,4 (Fraser et al., 1989)	8,7 (Ricós et al., 2004)
VCM	0,4	0,80	3,4	0,20	2,3	1,1 (Dot et al., 1992)	4,2 (Fraser et al., 1989)	4,0 (Ricós et al., 2004)
HCM	0,7	1,3	4,3	0,20	2,8	1,3 (Dot et al., 1992)	5,2 (Ricós et al., 1999)	5,0 (Ricós et al., 2004)
CHCM	0,52	1,1	2,3	0,40	3,3	1,6 (Dot et al., 1992)	2,8 (Ricós et al., 1999)	5,3 (Ricós et al., 2004)
RDW	1,4	2,0	4,6	0,40	6,1	3,7 (Costongs et al., 1985)	5,7 (Ricós et al., 1999)	10,8 (Ricós et al., 2004)
WBC	1,1	15,9	23,7	0,70	43,9	10,8 (Dot et al., 1992)	17,4 (Ricós et al., 1999)	33,8 (Ricós et al., 2004)
Neut	0,9	24,4	32,6	0,80	65,3	17,3 (Fraser et al., 1989)	23,1 (Ricós et al., 1999)	49,9 (Ricós et al., 2004)
Linf	1,8	14,7	25,1	0,60	40,5	10,8 (Costongs et al., 1985)	24,1 (Ricós et al., 1999)	32,2 (Ricós et al., 2004)
PLT	2,7	7,8	22,5	0,40	21,5	10 (Fraser et al., 1989)	21,9 (Ricós et al., 1999)	28,2 (Ricós et al., 2004)
CK	8,4	43,3	67,9	0,64	119,3	29,5 (Wu et al., 2009b)	40,0 (Ricós et al., 1999)	70,7 (Ricós et al., 2004)
CT	5,4	8,2	15,8	0,50	27,0	6,1 (Demacker et al., 1982)	15,2 (Ricós et al., 1999)	18,6 (Ricós et al., 2004)
AU	3,63	12,1	20,0	0,60	35,0	7,2 (Eckfeldt et al., 1994)	17,6 (Ricós et al., 1999)	26,7 (Ricós et al., 2004)
PCR	6,1	74,4	71,3	1,04	206,0	42,2 (Macy et al., 1997)	76,3 (Ricós et al., 1999)	163 (Ricós et al., 2004)
Cr	4,6	8,51	11,9	0,70	26,8	4,3 (Eckfeldt et al., 1994)	14,2 (Ricós et al., 1999)	13,3 (Ricós et al., 2004)
TG	5,1	24,0	36,6	0,65	66,4	22,4 (Smith et al., 1993)	37,2 (Ricós et al., 1999)	64,8 (Ricós et al., 2004)
Urea	5,4	14,4	20,0	0,70	42,5	9,5 (Eckfeldt et al., 1994)	18,3 (Ricós et al., 1999)	38,1 (Ricós et al., 2004)

CV_A= coeficiente de variação analítica, calculado a partir do soro/sangue controle (n=20); CV_I = coeficiente de variação intra-individual; CV_G= coeficiente de variação entre-sujeitos; II = índice de individualidade (II=CV_I/CV_G); RCV = *reference change value* (diferença crítica) (%).

A Figura 1 apresenta a média e os valores mínimo e máximo em cada indivíduo para analitos com $II < 0,50$; e os respectivos intervalos de referência para esta população. Apenas um indivíduo apresentou a média abaixo do intervalo de referência para hemoglobina, reforçando a necessidade de comparar estas análises com o RCV.

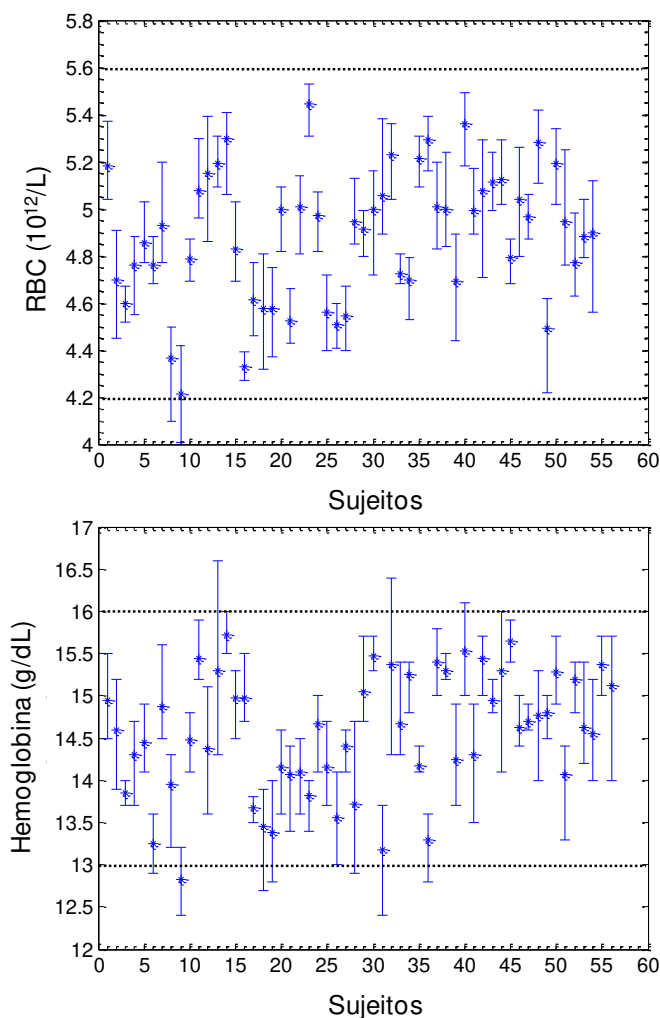


Figura 1 – Variação biológica para analitos com índice de individualidade (II) $< 0,5$. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos ($n=300$) da mesma população fisicamente ativa.

A Figura 2 mostra que analitos com $II > 0,6$ apresentam maior possibilidade de detectar indivíduos com valores fora dos limites de referência para esta população.

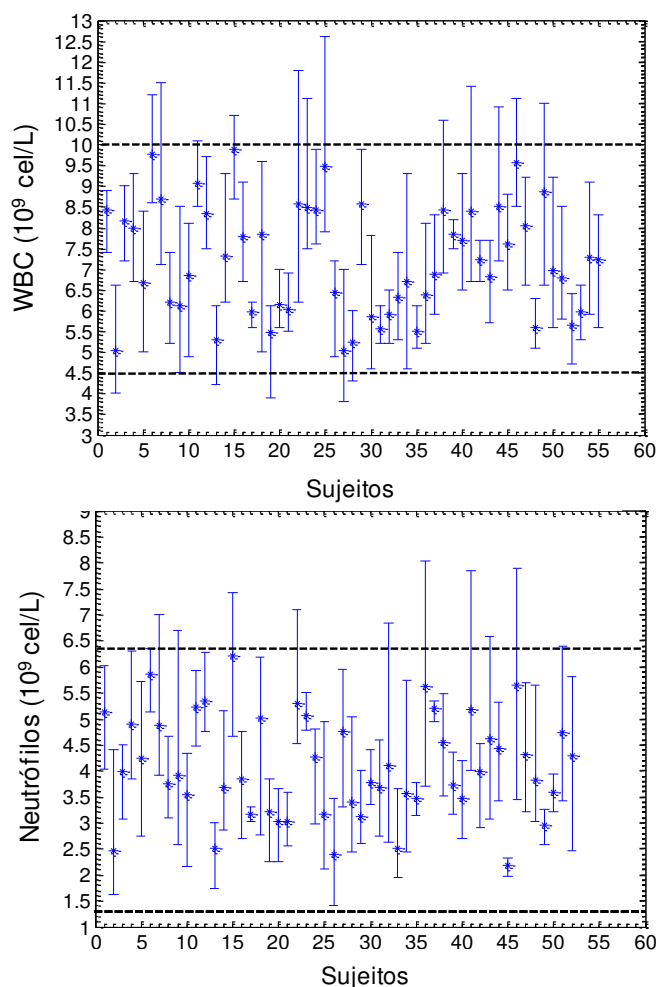


Figura 2 – Variação biológica para analitos com índice de individualidade (II) $> 0,5$. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos ($n=300$) da mesma população fisicamente ativa.

DISCUSSÃO

Estabelecemos neste estudo os componentes de variação biológica de analitos em uma população de sujeitos fisicamente ativos, após serem submetidos a quatro meses de atividade física regular e planejada. Calculamos os respectivos RCVs de parâmetros bioquímicos e hematológicos comumente utilizados no monitoramento de atletas (Lac & Maso, 2004, Lazarim et al. 2009). Os valores de RCV já foram estabelecidos para população saudável não exercitada (Ricos et al., 2004), e aplicados na avaliação de toxicidade induzida por medicamentos (Wu et al., 2009b), no monitoramento pós-operatório de transplantes renais (Biosca et al., 2001), e especificação da qualidade e avaliação de níveis séricos de vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis (Talwar et al., 2005). Entretanto, até agora não há relatos da aplicação dos RCVs na área da ciência dos esportes.

Uma das aplicações importantes do cálculo dos componentes de variação biológica é fornecer dados para especificação da qualidade analítica (Fraser, 2001). Quanto maior o CV_A , maior será o erro inserido no resultado. Apesar da variabilidade analítica ser removida pela fórmula de Fraser, ela é um componente do RCV, e pode aumentar artificialmente seus valores. Nós adotamos como valor permitido para a imprecisão dos métodos o valor de $CV_A < 0,5 \times CV_I$. Nesta situação a variabilidade adicionada ao resultado é de 11,8%, considerada desejável (Fraser et al., 1997; Harris, 1979). O CV_A de todos os parâmetros calculados em nosso estudo foi $< 0,5 \times CV_I$, com exceção da dosagem de colesterol e RDW, mesmo assim estes valores ficaram abaixo do CV_I , e dentro do limite máximo permitido de $0,75 \times CV_I$ (Fraser et al., 1997).

O CV_A calculado para todas as análises foi menor que 5% com exceção da CK (8,4 %), PCR (6,1 %), colesterol (5,4%), triglicérides (5,1%) e uréia (5,4%). Mesmo assim, estes valores estão em concordância com valores de CV_A mostrados por outros grupos que consideraram as especificações da qualidade baseadas na variação biológica (Smith et al., 1993; Eckfeldt et al., 1994; Ross & Fraser, 1998; Fraser & Petersen, 1999; Rifai & Warnick, 2004), sugerindo que a atividade física regular e planejada promove adaptações que se refletem no aumento da variação biológica de alguns, mas não todos, constituintes sanguíneos.

Os valores de CV_I e CV_G para células vermelhas e plaquetas foram menores que aqueles demonstrados por outros autores (Tabela 2). Estudos anteriores, sobre variabilidade biológica de células sanguíneas tem demonstrado relação inversa entre o tempo de vida da célula e o CV_I (Jones et al., 1996). Eritrócitos, que tem tempo médio na circulação de aproximadamente 120 dias, tem CV_I menor em comparação aos leucócitos, que tem uma média de 10 dias na circulação (Costongs et al., 1985; Fraser et al., 1989). Estes dados estão de acordo com nossos resultados (Tabela 2). Além disso, os eritrócitos de atletas permanecem por menos tempo na circulação em comparação aos sujeitos não exercitados, principalmente devido à hemólise induzida pelo exercício que é inerente à modalidade praticada (Weight et al., 1991). Isto pode ter levado aos valores levemente menores observados com componentes de variação biológica da série vermelha neste estudo (Tabela 2).

A células vermelhas apresentaram os menores valores de II , como observado por Statland et al. (1978), bem como a distribuição de valores intra-individuais (Figura 1) ocupando uma pequena extensão do intervalo de referência na maioria dos sujeitos.

Estes achados sugerem o uso dos valores de RCV em detrimento dos intervalos de referência tradicionais, porque somente indivíduos situados próximos aos intervalos de referência inferior e superior seriam detectados. Como apresentado na Figura 1, existe correspondência entre RBC e Hb para a maioria dos sujeitos, exceto para os sujeitos 31 e 36. Estes valores podem ser sugestivos de HCM abaixo da média desta população em estudo.

Os valores de RCV para o eritrograma foram levemente menores em indivíduos fisicamente ativos em comparação aos sedentários (Tabela 2). O estreito limite percentual do RCV mostrado aqui para indivíduos fisicamente ativos pode auxiliar no aumento da sensibilidade/especificidade para a interpretação de resultados de populações heterogêneas, principalmente quando consideramos a proposição de um passaporte hematológico do atleta para monitoramento longitudinal e possível identificação de doping para o aumento do transporte de oxigênio, incluindo a utilização de eritropoietina recombinante e qualquer forma de transfusão ou manipulação nas variáveis relacionadas à série vermelha (Malcovati et al., 2003; Robinson et al., 2007).

Por outro lado, a contagem de leucócitos e todos os parâmetros bioquímicos mensurados aqui demonstraram valores maiores de CV_I e CV_G para indivíduos fisicamente ativos que para o grupo não fisicamente ativo, indicando efeito do treinamento sobre estes analitos. Consequentemente, os valores de RCV também foram maiores nos indivíduos fisicamente ativos que nos sedentários (Tabela 2).

Vários estudos utilizando diferentes tipos de protocolos de exercício já demonstraram que os analitos quantificados sofrem algum tipo de modulação pelo exercício (Sawka et al., 2000; Lac & Maso, 2004; Lazarim et al., 2009). Os níveis de

creatinina podem ser modificados por mudanças agudas na taxa de filtração glomerular durante o exercício (Banfi et al., 2009). Entretanto, os resultados apresentados aqui mostraram que os valores de creatinina sérica não diferiram daqueles observados normalmente em população sedentária. Os maiores valores de CV_I e RCV para creatinina refletem provavelmente grande variabilidade da massa muscular entre os sujeitos fisicamente ativos.

A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) que resulta da alta atividade muscular (Pattwell et al., 2004) pode ser responsável pelo aumento do dano muscular e a subsequente propagação da resposta inflamatória (Peake et al., 2007), bem como pelas concentrações plasmáticas aumentadas de ácido úrico (Finaud et al., 2006), o principal antioxidante em tecido e plasma (Lippi et al., 2008). Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que o limite superior (percentis 97.5 e 90) para a atividade da enzima CK em jogadores de futebol foi 1338 U/L e 975 U/L, respectivamente. Que são marcadamente elevados em relação aos valores previamente reportados na literatura para não praticantes de atividade física (Lazarim et al., 2009).

Postula-se que quando o RCV é maior que a distância entre os valores da primeira medida analítica e o limite de referência, o uso do RCV pode não produzir grandes benefícios, porque o intervalo de referência pode ser cruzado, antes do RCV ser significativo (Iglesias et al., 2005). A distribuição dos valores intra-individuais nos analitos mostrados na Figura 2 confirmam a maior possibilidade de detectar mais indivíduos com valores fora dos limites de referencia tradicionais. Entretanto, mesmo com $II > 0,6$, os valores de RCV podem contribuir para o monitoramento dos efeitos de

treinos e competições com maior sensibilidade/especificidade. Os valores de RCV que foram calculados neste estudo indicam, por exemplo, que a atividade da enzima CK precisa ultrapassar uma diferença maior que 119% entre duas análises consecutivas no mesmo sujeito para indicar sobrecarga e não ser simplesmente consequência da variação biológica e analítica.

Na prática da medicina esportiva é comum o uso de biomarcadores de sobrecarga para ajustar períodos de treinamento/repouso. Particularmente quando as análises são repetidas ao longo da temporada esportiva, o RCV para análises bioquímicas e contagem de leucócitos em indivíduos fisicamente ativos permite uma descrição mais acurada das adaptações induzidas pelo treinamento físico sistematizado. Além disso, a determinação do RCV pode contribuir para o monitoramento e identificação de possível doping através de marcadores relacionados às células vermelhas do sangue.

CAPÍTULO 2

DIFERENÇA CRÍTICA APLICADA AO MONITORAMENTO DE JOGADORES DE FUTEBOL

Artigo em formato *short communication* a ser submetido no periódico: *Clinical Journal of Sports Medicine*.

Diferença crítica aplicada ao monitoramento de jogadores de futebol

Lázaro Alessandro S. Nunes¹, René Brenzikofer², Denise Vaz de Macedo¹

1. Laboratório de Bioquímica do Exercício - LABEX, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas – Unicamp, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Barão Geraldo, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

2. Laboratório de Instrumentação em Biomecânica, Faculdade de Educação Física, Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

Introdução: Na prática da medicina do esporte é comum o uso de biomarcadores de sobrecarga para ajustar os períodos de treino e descanso. Quando estas análises são repetidas durante a temporada competitiva, uma ferramenta útil para verificar se a diferença entre duas análises consecutivas é significativa e biologicamente relevante é a utilização da diferença crítica ou *reference change value* (RCV). O RCV leva em consideração os vários componentes de variação intrínseca que afetam os resultados laboratoriais. Recentemente estabelecemos o RCV para alguns analitos no sangue de indivíduos fisicamente ativos. Nosso objetivo no presente trabalho foi verificar a aplicabilidade do RCV e intervalos de referência para parâmetros bioquímicos e hematológicos previamente estabelecidos para monitorar efeitos de treinos e competição em jogadores de futebol da categoria sub-20. **Materiais e Métodos:** Cinquenta e seis jogadores de futebol, idade (17-19 anos) participaram deste estudo. Os atletas foram avaliados através de cinco coletas de sangue em intervalos mensais (C₁-C₅). O hemograma foi realizado no aparelho KX-21N Sysmex® e os parâmetros bioquímicos no analisador automatizado Autolab (Boehringer). A diferença percentual entre os resultados das análises em série foram calculados e comparados ao RCV para detectar mudanças significativas. Os valores de RCV_{95%} previamente determinados foram: hemoglobina=8,0%; contagem de leucócitos = 43,9%; creatina quinase - CK = 119,3%; uréia=42,5% e ácido úrico = 35%. **Resultados:** Oito atletas apresentaram valores de hemoglobina significativamente aumentados em C₃. Três atletas apresentaram valores de CK acima de 119% em C₄. Nove atletas foram detectados com valores de leucócitos elevados em ao menos um momento do estudo. Os valores de uréia apresentaram elevação em nove atletas nos dois primeiros meses de treino. Por outro lado, todos estes analitos se encontravam dentro dos limites de referência para população fisicamente ativa. **Conclusões:** Alterações significativas podem ocorrer em resultados em série, mesmo estando dentro dos intervalos de referência populacionais. Aplicar o RCV no monitoramento de treinos pode aumentar a sensibilidade de interpretação de resultados de testes sanguíneos, contribuindo para a individualização de regimes de treino ou intervenções medico/nutricionais.

Palavras chave: Variação biológica, creatina quinase, treinamento, futebol, variação biológica.

ABSTRACT

In the practice of sports medicine it is common to use biomarkers of workload to adjust training/rest periods. Particularly, when analyses are repeated throughout the sport season a better tool could be verifying if the difference between two consecutive analyses is significant and biologically relevant through the *reference change value* (RCV), which takes into consideration the various components of intrinsic variation that affect laboratory assays. Recently we have established RCVs for physically active subject's blood analytes. Our aim was to verify the applicability of RCV and reference intervals determined for hematological and biochemical analyses for monitoring a training/competition effects in soccer players. **Materials and Methods:** Fifty-six soccer players (17-19 years old) participated. The athletes were evaluated through five blood samples (C₁-C₅) collected monthly, conducted with a KX-21N Sysmex® analyzer and an Autolab analyzer (Boehringer). The percent differences between serial results were calculated for each subject and compared with RCV_{95%} to detect significant changes (RCV_{95%} previously determined were: hemoglobin=8.0%; leucocytes count=43.9%; creatine kinase=119.3%; urea=42.5% and urate=35.0%). **Results:** Eight athletes presented hemoglobin values significantly increased at C₃. Three athletes presented values for creatine kinase activity above of 119% at C₄. Nine athletes were detected with leucocytes count elevated at least in one moment of the study. The urea was increased in most of the subjects in the first two months of training. Interestingly all these altered analytes were inside of reference values for physically active population. **Conclusion:** As significant changes can occur when serial results are all within the population reference interval, to apply RCV in training monitoring can increase the sensitivity of the interpretation of blood results contributing to individualize medical/nutritional programs or interventions only when necessary.

Key words: Reference change value, biological variation, creatine kinase, soccer players

INTRODUÇÃO

O treinamento esportivo consiste na somatória de repetidas sessões de exercícios realizadas de forma sistematizada e numa sequência programada, com o objetivo de gerar um processo adaptativo contínuo e consequente aumento do desempenho. Para que isso ocorra, aplicam-se sobrecargas progressivas de esforço durante sessões de treino, seguidas de período de recuperação. O estresse mecânico induzido durante o treino é um dos principais responsáveis pelo dano muscular (Fielding et al., 1993). Ele está associado com a resposta de fase aguda inflamatória, produção de radicais livres de oxigênio (EROs), elevação de citocinas e outras moléculas inflamatórias (Aoi et al., 2004).

Atletas profissionais de rendimento, como por exemplo, jogadores de futebol, são submetidos a uma rotina anual de treinos e competições intercaladas com períodos de recuperação nem sempre adequados. O futebol é uma modalidade esportiva que alterna momentos de alta intensidade (atividades anaeróbicas), baixa intensidade (atividades aeróbicas) e até momentos de recuperação ativa ou passiva (Bangsbo et al., 2007). Uma temporada competitiva de futebol inclui períodos semanais de treinos, jogos e recuperação. Geralmente os jogadores devem estar prontos para um novo jogo entre 3 a 6 dias (Ispirlidis et al., 2008).

Na prática da medicina do esporte é cada vez mais comum a utilização de biomarcadores sanguíneos para individualização das cargas de treino ou períodos de descanso com o intuito de prevenir lesões musculares (Lazarim et al., 2009). Além disso, as análises sanguíneas podem fornecer diferentes informações sobre o estado nutricional do atleta (Hawley et al., 2006), capacidade de transporte de oxigênio

(Kuipers et al., 2010), patologias inerentes à modalidade praticada, como por exemplo anemias e distúrbios do metabolismo do ferro (Mercer et al., 2005; Robinson et al., 2006) e detecção de doping sanguíneo (Sottas et al., 2009).

Entretanto, uma das dificuldades para verificar os efeitos do treinamento a partir de análises sanguíneas é a falta de valores de referência apropriados obtidos de população fisicamente ativa. A maioria dos estudos que mostra efeitos positivos da atividade física ou adaptações induzidas pelo treinamento utiliza comparação com grupo controle sedentário (fisicamente inativo). Sujeitos que praticam atividade física regular e moderada são mais saudáveis e formam um grupo mais apropriado para comparações em estudos com atletas (Booth & Lee, 2006).

Além disso, para que biomarcadores sanguíneos sejam utilizados corretamente na individualização de treinos, é necessário que estas análises sejam repetidas ao longo da temporada competitiva. Neste caso, uma ferramenta interessante para verificar se a diferença entre duas análises consecutivas do mesmo indivíduo é significativa e biologicamente relevante seria a aplicação da diferença crítica ou *Reference Change Value* (RCV) (Nunes et al., 2010).

O RCV leva em consideração os componentes de variação intrínseca que afetam os resultados laboratoriais (variação pré-analítica e variação analítica) e aqueles relacionados à variação biológica normal intraindividual (Omar et al., 2008). Recentemente, estabelecemos os valores de RCV para parâmetros bioquímicos e hematológicos no sangue de indivíduos fisicamente ativos (Nunes et al., 2010).

Nosso objetivo no presente trabalho foi verificar a aplicabilidade do RCV e intervalos de referência determinados para alguns parâmetros hematológicos e

bioquímicos para monitorar efeitos de treinos e competição em jogadores de futebol da categoria sub-20 durante cinco meses da temporada competitiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Sujeitos

Participaram deste estudo 56 jogadores de futebol, sexo masculino, idade (18 ± 1 anos). Os atletas foram avaliados durante período de quatro meses que incluiu: pré-temporada de treinos e período competitivo (torneio de futebol da categoria sub-20). Os sujeitos participantes responderam a um questionário sobre uso de medicação e queixa de dor. Os voluntários foram informados sobre a pesquisa e assinaram um termo de consentimento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – FCM/Unicamp (CAAE: 0200.0.146.000-08).

Coleta de Amostras de Sangue e Análises Sanguíneas

Os sujeitos foram avaliados longitudinalmente através de cinco coletas de sangue: C1 = antes do início dos treinos; C2 = após 1 mês (treinos); C3 = após 2 meses (treinos e competição); C4 = após 3 meses (treinos e competição) e C5 = após 4 meses (competição).

Todas as amostras de sangue foram coletadas após 2 dias sem atividade física para evitar os efeitos de variações hemodinâmicas e hemodiluição aguda induzida pelo exercício (Sawka et al., 2000). As amostras de sangue foram coletados sob condições padronizadas: 2,0 mL de sangue venoso total em tubos a vácuo contendo EDTA/K₃ para a determinação realização do hemograma e 8,0 mL de sangue venoso em tubos com gel separador Vacuette[®] (Greiner Bio-one) para obtenção do soro utilizado nas

dosagens bioquímicas. Os voluntários permaneceram sentados e o sangue foi coletado após jejum de 12 horas no período da manhã, transportado em temperatura de 4°C para o laboratório dentro de 30 minutos, centrifugado sob-refrigeração a 1800xg por 10 minutos, imediatamente separado e protegido da luz.

As análises hematológicas foram realizadas no aparelho KX-21N Sysmex®. As dosagens bioquímicas (concentração de ácido úrico, uréia, creatinina e atividade da enzima creatina quinase-CK) foram realizadas com kits comerciais (Wiener Lab Rosário Argentina) no analisador bioquímico Autolab Boehringer. Todas as amostras foram realizadas juntamente com a utilização do soro/sangue controle comerciais em dois níveis.

Análises Estatísticas

As diferenças percentuais entre os resultados consecutivos das análises do mesmo atleta foram calculadas através de planilhas do programa Excel® e comparadas com o RCV_{95%} previamente estabelecido para detectar mudanças significativas.

Os valores de RCV_{95%} previamente estabelecidos foram: hemoglobina = 8,0%; Contagem de eritrócitos (RBC) = 8,3%; Contagem de leucócitos (WBC) = 43,9%; neutrófilos = 65,3%; CK = 119,3%, creatinina = 26,8%; uréia = 42,5% e ácido úrico = 35,0% (Nunes et al. 2010). A atividade da CK apresentou valores distorcidos à direita, optamos pela transformação em logaritmo natural para normalizar os dados apresentados (Wu et al., 2009b). Os gráficos foram elaborados através do programa Matlab 7.0.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o resultado das análises bioquímicas nos atletas que apresentaram valores significativamente alterados em relação ao momento anterior, quando comparados ao RCV.

Tabela 1. Análises bioquímicas com alterações significativas monitoradas durante temporada de treinos e competições.

Analito	Momento	Atleta	Resultado atual – anterior (Δ)	Alteração (%)
CK (U/L) RCV _{95%} = 119,3% IR = 1309 (U/L)	C3	35	535 – 223 (312)	+139,9
	C4	14	951 – 345 (606)	+175,7
		19	942 – 289 (653)	+226,0
Uréia (mmol/L) RCV _{95%} = 42,5% IR = 3 – 8,5 (mmol/L)	C2	8	6,2 – 3,7 (2,5)	+68,2
		14	4,7 – 3,2 (1,5)	+47,4
		19	7,7 – 5,0 (2,7)	+53,3
		23	4,4 – 2,7 (1,7)	+62,5
		25	3,8 – 2,6 (1,2)	+43,8
		27	5,3 – 3,5 (1,8)	+52,4
		29	4,9 – 3,4 (1,5)	+45
		32	6,4 – 3,7 (2,7)	+72,7
	C3	9	4,2 – 4,34 (1,3)	+47,1
	C4	3	4,9 – 2,9 (2)	+70,6
		32	3,3 – 6,3 (- 3)	-47,4
		38	5,8 – 4,0 (1,8)	+45,8
		42	3,8 – 2,6 (1,2)	+43,8
Creatinina (μ mol/L) RCV _{95%} = 26,8% IR = 77,8 – 132,6 (μ mol/L)	C3	4	113 – 87, 6 (25,4)	+29,3
		7	95,4 - 74,2 (21,2)	+28,6
		15	93,7 – 70,7 (23)	+32,5
		42	95,4 – 73,4 (22)	+30,1
		44	121,0 – 88,0 (33)	+37

IR = Intervalo de referência obtido de indivíduos fisicamente ativos da mesma faixa etária (n=300). Δ = diferença entre duas análises consecutivas do mesmo indivíduo.

Não foram detectadas alterações individuais nas concentrações de ácido úrico com a utilização do RCV. Entretanto, cinco atletas apresentaram valores de ácido úrico inferiores ao intervalo de referência para população fisicamente ativa. Alguns atletas apresentaram valores elevados de uréia em C2 (Tabela 1), sugerindo aumento no *turnover* proteico após o primeiro mês de treinamento.

A Tabela 2 mostra os atletas que apresentaram valores de leucócitos significativamente alterados em relação ao momento anterior, quando aplicados o RCV.

O atleta 19 apresentou alterações significativas para CK (Tabela 1), WBC e neutrófilos (Tabela 2) em C4, quando comparamos seus resultados ao RCV.

Tabela 2. Alterações significativas observadas nos leucócitos e neutrófilos durante temporada de treinos e competições.

Analito	Coleta	Atleta	Resultado atual – anterior (Δ)	Alteração (%)
WBC ($10^9/L$) RCV_{95%} = 43,9% IR = 4,5 – 10,1 ($10^9/L$)	C2	1	7,8 – 4,5 (3,3)	+73,3
		4	6,2 – 4,0 (2,2)	+55
	C3	14	9,6 – 6,5 (3,1)	+47,7
		15	7,2 – 4,9 (2,3)	+46,9
		44	9,3 – 5,3 (4,0)	+75,5
	C4	19	10,1 – 5,4 (4,7)	+105,6
	C5	20	9,8 – 6,6 (3,2)	+48,5
		47	8,1 – 4,8 (3,3)	+68,8
		53	7,1 – 4,5 (2,6)	+57,8
Neutrófilos ($10^9/L$) RCV_{95%} = 65,3% IR = 1,8 – 6,7 ($10^9/L$)	C2	1	5,1 – 2,3 (2,8)	+119,5
		4	4,5 – 2,4 (2,1)	+84,9
		23	4,0 – 2,4 (1,6)	+69,7
	C3	14	6,9 – 3,7 (3,2)	+86,4
		15	4,8 – 2,5 (2,3)	+92,9
		44	6,4 – 3,0 (3,4)	+113,8
	C4	19	8,6 – 3,0 (5,6)	+182,7
		42	3,9 – 2,2 (1,7)	+79,6
	C5	20	7,9 – 3,7 (4,2)	+112,2
		47	4,8 – 1,9 (2,9)	+150,8
		53	4,9 – 2,4 (2,5)	+104,6

IR = Intervalo de referência obtido de indivíduos fisicamente ativos da mesma faixa etária (n=300). Δ = diferença entre duas análises consecutivas do mesmo indivíduo.

Tabela 3. Alterações significativas observadas para hemoglobina e RBC durante temporada de treinos e competições.

Analito	Coleta	Atleta	Resultado atual – anterior(Δ)	Alteração (%)
Hemoglobina (g/dL) RCV _{95%} = 8% IR = 13 – 16 (g/dL)	C2	23	13,2 – 14,4 (-1,2)	-8,3
	C3	7	15,2 – 14,0 (1,2)	+8,6
		15	15,7 – 14,5 (1,2)	+8,3
		17	15,3 – 13,3 (2,0)	+15
		23	14,8 – 13,2 (1,6)	+12,1
		39	16,5 – 14,7 (1,8)	+12,2
		42	13,8 – 12,5 (1,3)	+10,4
		43	15,6 – 13,7 (1,9)	+13,9
	C4	23	13,6 – 14,8 (-1,2)	-8,1
RBC ($10^{12}/L$) RCV _{95%} = 8,3% IR = 4,4 – 5,6 ($10^{12}/L$)	C3	7	5,3 – 4,8 (0,5)	+10
		17	5 – 4,3 (0,7)	+15,9
		20	4,3 – 4,8 (-0,5)	-9,8
		23	5,1 – 4,6 (-0,5)	+10,3
		39	5,4 – 4,9 (0,5)	+10,4
		42	5,1 – 4,6 (0,5)	+10,4
		43	5,3 – 4,7 (0,6)	+14,1
	C4	20	5,0 – 4,3 (0,7)	+10,3

IR = Intervalo de referência obtido de indivíduos fisicamente ativos da mesma faixa etária (n=300). Δ = diferença entre duas análises consecutivas do mesmo indivíduo.

O número de células vermelhas (RBC) e concentração de hemoglobina aumentaram significativamente no momento C3, principalmente, nos sujeitos situados próximos ao limite inferior do intervalo de referência, indicando uma adaptação positiva induzida pelo treinamento.

As Figuras 1 e 2 (A e B) mostram duas modalidades de análise de resultados (RCV e IR) para evidenciar os efeitos de treino sob os analitos, em relação ao indivíduo e ao grupo de referência.

A Figura 1 (A e B) mostra que alterações significativas nos valores da atividade de CK podem ocorrer entre duas análises consecutivas do indivíduo, mesmo quando os resultados em série estão dentro do IR populacional.

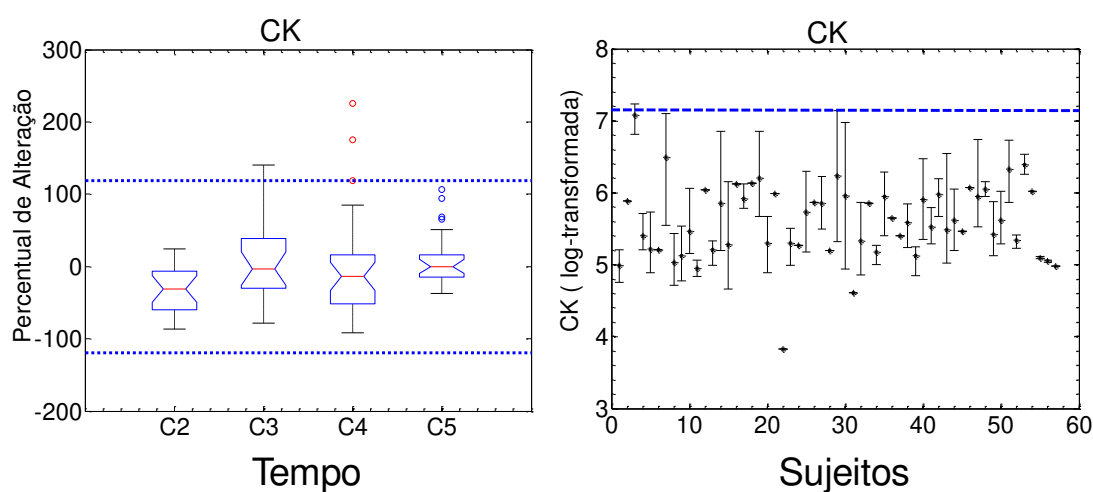


Figura 1A. Percentual de alteração entre análises sucessivas de jogadores de futebol durante temporada competitiva. Linhas pontilhadas indicam o percentual de $RCV_{95\%}$ para CK = 119,3%

Figura 1B. Valores de CK (média, mínimo e máximo) para cada jogador de futebol durante 5 coletas. Linhas pontilhadas indicam o intervalo de referência (97,5% limite superior = 1309 U/L) para população fisicamente ativa.

A Figura 2 (A e B) mostra que embora não exista diferença entre as análises de ácido úrico realizadas em série no mesmo indivíduo, alguns atletas podem se situar fora do IR populacional, necessitando assim de intervenções individualizadas.

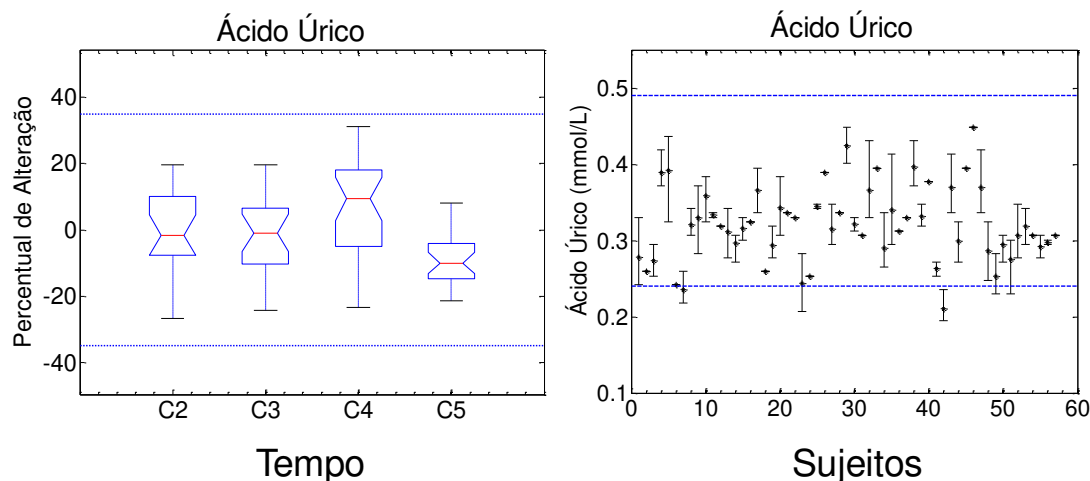


Figura 2A. Percentual de alteração entre análises sucessivas de jogadores de futebol durante temporada competitiva. Linhas pontilhadas indicam o percentual de $RCV_{95\%}$ para Ácido Úrico = 35%

Figura 2B. Valores de ácido úrico (média, mínimo e máximo) para cada jogador de futebol durante 5 coletas. Linhas pontilhadas indicam o intervalo de referência (2,5% limite inferior = 0,24 mmol/L e 97,5% limite superior = 0,49 mmol/L) para população fisicamente ativa.

DISCUSSÃO

Neste estudo, procuramos aplicar valores de RCV obtidos de indivíduos fisicamente ativos (Nunes et al., 2010) no monitoramento de treinos e temporada competitiva de uma equipe de futebol da mesma faixa etária. Monitorar parâmetros bioquímicos e hematológicos durante temporada competitiva em atletas pode ser uma ferramenta útil na avaliação dos efeitos adaptativos de treinos e permite a individualização de cargas de treinos e períodos de descanso.

A prática do futebol está associada com adaptações fisiológicas (ex. leucocitose, aumento na concentração de catecolaminas e maior geração de EROs), que aumentam

o risco de lesão muscular no atleta (Fatouros et al., 2010). A atividade plasmática da enzima CK vem sendo proposta como um marcador sobrecarga muscular e detecção precoce de fadiga. Resultados prévios de nosso laboratório mostram que o limite superior do intervalo de referência (percentil 97.5) em jogadores de futebol profissionais da primeira divisão do futebol brasileiro na categoria adulta é de 1338 U/L (Lazarim et al., 2009). Este valor é muito próximo do intervalo de referência adotado para indivíduos fisicamente ativos em nosso estudo (Tabela 1). Ao observarmos o comportamento da CK durante o período de estudo, notamos que todos os atletas possuíam valores que se encontravam dentro dos intervalos de referência populacionais (Figura 1 B), porém, três atletas apresentaram alterações significativas entre duas análises consecutivas, ultrapassando o valor de RCV (Tabela 1).

Ao observarmos o atleta 19 (Tabela 1 e 2) notamos que ele foi submetido ao mesmo regime de treinos e competições que os demais atletas, porém apresentou valores significativamente alterados para CK, leucócitos e neutrófilos após três meses do início da temporada. É importante notar que seus valores não apresentam alterações se considerarmos o intervalo de referência para uma população fisicamente ativa, exceto para neutrófilos. Estas alterações individuais podem estar relacionadas à resposta inflamatória e ao dano muscular após este período de treinos e competições, bem como deterioração aguda no desempenho (Ispirlidis et al., 2008).

A uréia é um produto final de degradação do nitrogênio proteico, ela é sintetizada no fígado e excretada por via renal (Hartmann & Mester, 2000). Observamos em nosso estudo (Tabela 1) que após o primeiro mês de treinos a maioria dos atletas apresentou alterações significativas dos níveis séricos de uréia quando comparados ao RCV, que

podem significar aumento da degradação proteica (situação catabólica). Outros fatores também podem influenciar na elevação dos níveis séricos de uréia durante o treinamento como, por exemplo, diminuição da ingestão de água e falta de glicogênio (reposição inadequada de carboidratos pós-treino) (Hartmann & Mester, 2000).

A concentração de creatinina no soro é um dos marcadores de função renal mais utilizado e aceito na clínica médica. A creatinina sérica pode sofrer influência de idade, sexo, dieta e massa corporal (Perrone et al., 1992). A atividade física pode provocar mudanças agudas na taxa de filtração glomerular alterando os valores de creatinina sérica (Banfi et al. 2009), além disso atletas que possuem mais massa muscular possuem valores de creatinina sérica mais elevados que não praticantes de atividade física (Banfi & Del Fabro, 2006). Os valores de creatinina observados em alguns atletas (Tabela 1) podem indicar aumento da massa muscular.

Os valores de hemoglobina (Tabela 3) aumentaram significativamente nos sujeitos que se situavam próximo ao limite inferior do intervalo de referência, estes resultados estão em concordância com dados da literatura que relatam as adaptações positivas ao treinamento, refletindo na melhora da capacidade de transporte de oxigênio devido à expansão de volume plasmático e aumento do número de eritrócitos (Sawka et al., 2000; Convertino, 2007).

É importante ressaltar que as alterações observadas em nosso estudo foram detectadas pela diferença crítica (RCV), porém se encontravam dentro dos limites de referência. A Figura 1 (A) mostra, por exemplo, que indivíduos podem ser detectados pelo RCV e não serem detectados pelos intervalos de referência tradicionais (Figura 1B). Por outro lado, é importante conhecer os intervalos de referência populacionais,

pois analitos como o ácido úrico (Figura 2A), um dos principais antioxidantes em tecido e plasma (Lippi et al., 2008), podem não apresentar diferenças significativas entre análises consecutivas e mostrar indivíduos fora dos limites de referência (Figura 2B).

CONCLUSÃO

O RCV e o IR obtidos de população de referência específica fornecem informações complementares que podem ser aplicadas para monitorar treinos e competições. Ambas as ferramentas podem aumentar a sensibilidade/especificidade na interpretação de testes laboratoriais, contribuindo para a individualização de programa ou intervenções medico/nutricionais.

CAPÍTULO 3

SALIVA COMO FLUÍDO DIAGNÓSTICO: REVISÃO SOBRE AS POTENCIALIDADES E LIMITAÇÕES DE SUA UTILIZAÇÃO NO ESPORTE

Artigo a ser submetido em português no periódico: Revista Brasileira de Medicina do Esporte.

Saliva como fluido diagnóstico: revisão sobre as potencialidades e limitações de utilização no esporte

Lázaro Alessandro Soares Nunes¹ & Denise Vaz de Macedo^{1*}

1. Laboratório de Bioquímica do Exercício - LABEX, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas – Unicamp, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Barão Geraldo, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

* Autor correspondente: fone 019 3521 6145, fax 019 3521 6129; E-mail:

labex@unicamp.br

Resumo

A utilização de saliva como alternativa para o diagnóstico de patologias e/ou monitoramento de atletas em competições ou treinos é muito atrativa, devido à facilidade de obtenção da amostra, e por ser um método de fácil manejo e menos invasivo que a coleta venosa. A saliva é um fluido hipotônico em relação ao plasma. Contém compostos produzidos localmente nas glândulas salivares (imunoglobulina A e α -amilase), além de componentes difundidos do plasma (água, eletrólitos, proteínas, metabólitos e hormônios). A saliva desempenha funções importantes na proteção da mucosa oral contra micro-organismos e na digestão dos alimentos, sendo sua produção e composição dependente da atividade do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, cuja ação antagônica pode resultar em diferentes volumes de saliva com diferentes perfis proteico e iônico. O objetivo da presente revisão é apresentar uma análise crítica das potencialidades e limitações da utilização da saliva como ferramenta diagnóstica com enfoque no esporte. Embora existam estudos propondo seu uso no monitoramento de atletas em situações de exercício e *doping*, ainda é necessário padronizar algumas variáveis pré-analíticas tais como a escolha correta do melhor sistema de coleta disponível, que permita quantificar facilmente o volume com boa recuperação de amostra; horários de coleta bem definidos, de acordo com as possíveis variações circadianas do analito e evitar contaminação da saliva com sangue proveniente de lesões da mucosa oral. Para sua aplicação no esporte é extremamente importante também o estabelecimento de valores de referência para analitos quantificados na saliva, obtidos de uma população composta de sujeitos saudáveis e fisicamente ativos.

Palavras chave: Fluido oral, Monitoramento de atletas, Doping, Valores de referência.

Abstract

Saliva is as an alternative to diagnostic diseases and /or monitoring athletes in competition and training. It can be collected easily and it is less invasive method than venous sampling. Saliva is a hypotonic fluid compared to plasma, contains compounds produced locally in salivary glands (immunoglobulin A and α -amylase), components of systemic origin (water, electrolytes, proteins, metabolites and hormones). Saliva plays important roles in protecting oral mucosa against microbes and food digestion, its production and composition depend on autonomic nervous system activity that can result in different saliva volumes with different ionic and protein profiles. The aim of this review was to present a critical analysis of the potential and limitations of saliva use as a diagnostic tool, with focus on sports. There are studies suggesting its use in monitoring athletes in exercise situations and doping use. It is important to emphasize the need for some standardization of pre-analytical variables such as collection systems for quantifying the volume, with good sample recovery, well-defined collection schedules in accordance with the possible circadian variations and the correct choice of the best available collection system taking into consideration the analyte to be quantified. It is also extremely important to establish specific reference intervals for saliva samples from the physically active population, to apply in sports science

Key words: Oral fluid, Athletic monitoring, Doping, Reference values

1. Introdução

Um problema para o monitoramento de atletas através de biomarcadores ao longo de períodos de treino e/ou temporadas competitivas é que na maioria das vezes isso deveria ser feito através de coleta de amostras de sangue venoso em diferentes momentos do ano, o que para muitos indivíduos é um procedimento desconfortável. Artigo prévio do nosso laboratório mostrou que a punção digital pode ser uma alternativa interessante a punção venosa (Nunes et al., 2006). Esta técnica é menos invasiva e menos estressante, possibilitando o monitoramento de atletas durante e após testes físicos, treinos ou competições, sem grandes alterações da rotina. Além disso, os equipamentos automatizados existentes no mercado atualmente permitem trabalhar com volumes de amostra cada vez mais reduzidos, proporcionando a análise do sangue coletado em micro tubos (Nunes et al., 2006).

O interesse por fluidos biológicos menos invasivos para substituir o sangue tem crescido exponencialmente nos últimos anos (Gröschl, 2008). Neste contexto, a saliva é um dos líquidos biológicos que apresenta algumas vantagens distintas: pode ser coletada de forma não invasiva mesmo com treinamento limitado dos indivíduos, e não apresenta riscos durante a coleta, o que torna seu manejo muito mais seguro (Kaufman & Lamster 2002).

Alguns estudos propuseram o uso da saliva no diagnóstico e monitoramento de doença renal (Cardoso et al., 2009), desordens metabólicas (Trilck et al., 2005), detecção e quantificação de ácidos nucleicos virais (Raggam et al., 2008b) e monitoramento de drogas terapêuticas (Langman, 2007). Também existem estudos propondo seu uso no monitoramento de atletas em situações de exercício e doping

(Chicharro et al., 1994; Nieman et al., 2002; Walsh et al., 2002; Strano-Rossi et al., 2010).

O objetivo da presente revisão foi realizar uma análise das potencialidades e limitações da utilização da saliva como fluido diagnóstico no monitoramento de atletas.

2. Produção de Saliva

Nos seres humanos o fluido presente na cavidade oral origina-se principalmente de três glândulas salivares: parótida, submandibular e sublingual. Além dessas, outras glândulas menores e o fluido crevicular gengival podem contribuir com pequenos volumes para a formação do que é designado como “fluido oral” ou “saliva total”.

Cada glândula salivar secreta um tipo característico de saliva, com diferentes concentrações de íons (Kalk et al., 2002) e proteínas (Denny et al., 2008). Indivíduos adultos podem produzir normalmente de 0,5 a 1,5 L de saliva por dia (Chicharro et al., 1998). A contribuição relativa para formar a saliva varia se o indivíduo se encontra em situação basal (submandibular = 65%, parótida = 20%, sublingual = 5% e glândulas menores = 10%) em comparação à estimulação artificial, onde a glândula parótida contribui com mais de 50% do total de secreções salivares (Humphrey & Williamson, 2001). Em condições normais a saliva não estimulada apresenta taxa de secreção em torno de 0,1 mL/min, podendo alcançar o valor máximo de 7,0 mL/min quando estimulada artificialmente (Humphrey & Williamson, 2001). Durante e após o exercício de alta intensidade (acima do limiar anaeróbico) a secreção de saliva diminui, principalmente devido à ação adrenérgica, desidratação ou evaporação da saliva (Chicharro et al., 1998).

As glândulas salivares são formadas por células acinares, ductos celulares e células mioepiteliais irrigadas por redes de capilares sanguíneos (Figura 1). Nas células acinares a saliva primária é secretada como fluido isotônico em relação ao plasma (Aps & Martens, 2005). De acordo com a glândula de origem essa secreção pode ser serosa (parótida), mucosa (glândulas menores) ou mista (sublingual e submandibular) (Humphrey & Williamson, 2001). Os vários ácinos são conectados por ductos intercalados e a saliva secretada é drenada até a cavidade oral através de ductos estriados e excretorios.

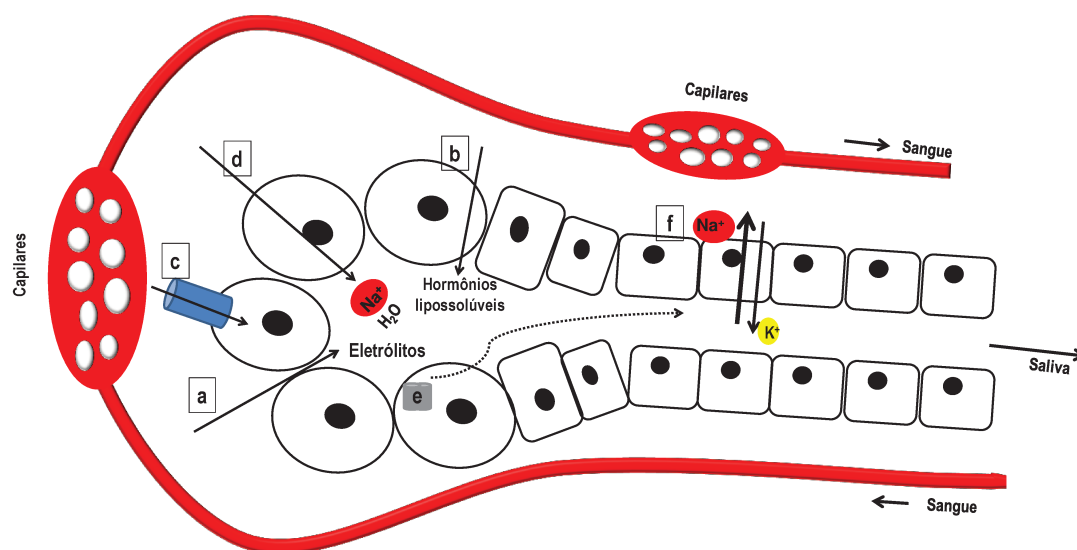


Figura 1. Mecanismos de transporte de componentes do plasma para a glândula salivar. (a) entrada de componentes por filtração simples. (b) entrada de compostos lipossolúveis por difusão passiva. (c) entrada de componentes por transporte ativo. (d) bombeamento ativo de íons Na⁺ e entrada concomitante de H₂O. (e) componente produzido e secretado pelas glândulas salivares (f) bombeamento de íons Na⁺ para o sangue, produzindo fluido hipotônico (Figura Adaptada de Wong, 2006).

O esquema apresentado na Figura 1 mostra que a passagem de componentes do plasma para a saliva pode envolver vários processos: ultrafiltração através das junções comunicantes entre células secretórias (a). Neste caso, somente moléculas com peso molecular inferior a 1.9 kDa podem ser transportadas (íons, água e alguns hormônios); transporte seletivo por difusão passiva de moléculas lipofílicas (hormônios esteróides) (b); transporte ativo através de canais iônicos (c) e bombeamento ativo de íons Na^+ com entrada concomitante de H_2O (d).

A saliva também contém compostos que são sintetizados primariamente nas células do ácino e em menor extensão nas células do ducto (e). Ou seja, alguns componentes da saliva não estão relacionados às concentrações plasmáticas e sim a uma resposta glandular local. Além disso, a concentração de vários eletrólitos muda devido ao transporte iônico ativo (f), que faz com que a saliva tenha uma característica hipotônica em relação ao sangue (Humphrey & Williamson, 2001; Aps & Martens, 2005).

Outros elementos como bactérias, células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, restos alimentares ou provenientes de contaminação com o fluido crevicular gengival, decorrente de processo inflamatório gengival também podem estar presentes na saliva. Esse fato não pode ser ignorado, uma vez que pode interferir nos ensaios analíticos (Chiappin et al., 2007; Aps & Martens, 2005; Kaufman & Lamster, 2002).

3. Funções e Regulação

A saliva desempenha funções importantes na imunidade da mucosa oral, na proteção dos dentes contra ação de microrganismos (Nieuw Amerongen et al., 2007), digestão de alimentos (Levine, 1993) e tamponamento de substâncias ácidas (Chiappin

et al., 2007). Os componentes presentes na saliva interagem executando diversas funções relacionadas aos alimentos, dentes e microorganismos (Tabela 1). Alguns componentes na saliva são redundantes e desempenham mais de uma função.

Tabela 1. Principais funções da saliva em relação a seus constituintes*

Alvo de Atuação	Função	Componente
Dentes	Inibição da desmineralização	Mucinas
	Remineralização	Proteína rica em prolina (PRPs), estaterina, cálcio e fosfato
	Lubrificação, viscosidade, elasticidade	PRPs, glicoproteínas, mucinas
	Tamponamento	Bicarbonato, fosfato e proteínas
Alimentos	Digestão	α -Amilase, DNase, RNase, lipase e protease
	Gustação	Zinco
Microorganismos	Antiviral	Mucinas, imunoglobulinas e cistatinas
	Antifúngica	Imunoglobulinas, mucinas e histatina
	Antibacteriana	Mucinas, lisozima, lactoferrina, Lactoperoxidase, histamina, aglutinina e cistatinas

*Adaptado de Nieuw Amerongen et al., 2007.

Vários fatores fisiológicos ou patológicos podem alterar quantitativamente e qualitativamente a produção de saliva, como por exemplo, a mastigação, fatores psicológicos, medicamentos, idade, higiene oral (Aps & Martens, 2005) e atividade física (Chicharro et al., 1998, Allgrove et al., 2008).

O fluxo e a composição da saliva são regulados principalmente pela atividade do sistema nervoso autônomo: as glândulas serosas estão sob o controle do sistema nervoso simpático e as sero-mucosas, por ambos, sistemas simpático e parassimpático. O estímulo α ou β adrenérgico (neural/farmacológico) pode modificar a quantidade, viscosidade, concentração proteica e iônica da saliva (Aps & Martens, 2005; Chiappin et al., 2007). A estimulação α -adrenérgica causa influxo de cálcio nas células secretórias, que resulta em líquido com alta concentração de proteínas. Devido à baixa presença de mucinas, este tipo de saliva apresenta baixo volume e viscosidade (Aps & Martens, 2005). A estimulação β -adrenérgica resulta em fluído com alto conteúdo proteico, viscosidade elevada, baixo volume e com aparência espumosa (Matsuo et al., 2000). As glândulas mucosas recebem apenas estímulos colinérgicos (parassimpático). Este tipo de estimulação resulta em saliva aquosa, com volume elevado, rica em eletrólitos, baixa viscosidade e baixa concentração de proteínas (Aps & Martens, 2005). Isso implica considerar a forte influencia do ciclo circadiano sobre alguns constituintes da saliva. Esse fato deve ser levado em consideração na interpretação dos resultados.

4. Constituintes da Saliva

4.1. Proteínas e Enzimas

As mucinas são secretadas por praticamente todas as glândulas salivares. Desempenham importante papel nas suas propriedades reológicas como viscosidade e elasticidade. Várias outras proteínas foram identificadas e estudadas através de técnicas analíticas abrangentes como a análise proteômica (Huang, 2004) ou específicas, tais como eletroforese capilar, espectrometria de massas,

radioimunoensaio (RIE), enzima imunoensaio (ELISA) e cromatografia líquida (Shirtcliff et al., 2001; Hu et al., 2005; Denny et al., 2008). Dentre estas proteínas podemos destacar: PRPs, albumina, imunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase, histatinas, estaterinas e α -amilase (Huang, 2004). Além da ação do sistema nervoso autônomo (Nater et al., 2005) e patologias como fibrose cística, diabetes (Rao et al., 2009), câncer (Jou et al., 2010) e epilepsia também alteram o perfil proteico da saliva (Aps & Martens, 2005). Estudos recentes do proteoma da saliva de portadores de diabetes tipo II, mostraram aumentos significativos na expressão de proteínas ligadas ao metabolismo e sistema imune quando comparados à saliva de indivíduos não diabéticos (Rao et al., 2009). Estes estudos podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de testes de diagnóstico precoce do câncer, diabetes e outras patologias (Jou et al., 2010).

O exercício físico também pode alterar a constituição proteica da saliva. Entre as proteínas salivares mais abundantes de interesse no esporte estão a enzima α -amilase salivar e imunoglobulina A (IgA), que possuem importante papel na imunidade da mucosa oral (Levine, 1993; Bishop & Gleeson, 2009). A IgA é sintetizada pelos linfócitos B da periferia do epitélio secretório e depois transportada através da membrana celular das células salivares e secretada na saliva (Nieuw Amerongen et al., 2004).

A IgA salivar tem sido muito estudada como marcador de função do sistema imune (Gleeson & Pyne, 2000). A IgA é uma imunoglobulina predominante nas secreções mucosas. Sua função é fornecer a primeira linha de defesa, atuando contra a

aderência e penetração de microrganismos na mucosa (Bishop & Gleeson, 2009). Interrompe também a replicação de patógenos através da neutralização intracelular, se ligando aos antígenos para facilitar sua eliminação do epitélio (Lamm, 1998). Indivíduos que possuem deficiência de IgA e pouco fluxo salivar apresentam alta incidência de infecções respiratórias no trato superior (Fox et al., 1985).

Os resultados produzidos por estudos que avaliaram os efeitos do exercício sobre as concentrações de IgA são inconsistentes. Alguns estudos reportaram decréscimo após sessões agudas de exercício de alta intensidade (Nieman et al., 2002; Walsh et al., 2002), outros nenhuma mudança (McDowell et al., 1991) e outros aumento (Blannin et al., 1998, Sari-Sarraf et al., 2007). A falta de padronização nas técnicas de coleta, análise e expressão de resultados obtidos de saliva torna difícil a comparação entre os estudos (Bishop & Gleeson, 2009). A maioria dos estudos mostrou também que não há diferença entre os níveis de IgA na saliva de atletas e indivíduos sedentários, exceto naqueles indivíduos que estão em regime de treino intensivo (Gleeson & Pyne, 2000).

A enzima α -amilase salivar representa cerca de 40 a 50% da quantidade total de proteínas produzidas pelas glândulas e liberadas na saliva (Zakowski & Bruns, 1985). Está envolvida na digestão dos carboidratos e na imunidade da mucosa oral (Levine, 1993). É sintetizada principalmente pela glândula parótida (80%). Sua liberação esta condicionada à ativação do sistema nervoso, autônomo através da ação de mediadores α e β -adrenérgicos (Nater & Rohleder, 2009). Além disso, ela pode responder de forma

aguda ao estímulo gustatório e mecânico da mastigação (Rohleder & Nater, 2009). A α -amilase salivar é uma proteína com funções protetoras importantes na mucosa oral.

Mais recentemente a α -amilase salivar também tem sido utilizada como indicador de estresse físico (Li & Gleeson, 2004) e psicológico (Chatterton et al., 1996; Nater & Rohleder, 2009), uma vez que sua atividade na saliva se correlaciona com os níveis séricos de adrenalina e cortisol (Chatterton et al., 1996). Estudos mostraram que a atividade da α -amilase aumenta em resposta a condições estressantes como exercício físico, calor, frio e testes comportamentais (Chatterton et al., 1996; Granger et al., 2007).

É importante observar que o pico desta enzima é alcançado entre 15 e 20 minutos antes da elevação da concentração de cortisol na saliva. Este padrão se deve ao tempo de resposta do sistema nervoso simpático (SNS), que é mais rápido em relação à resposta do eixo pituitário adrenal. A α -amilase é sintetizada e secretada diretamente da glândula salivar para a cavidade oral, enquanto o cortisol precisa ser liberado pela adrenal, percorrer a circulação e então se difundir passivamente até alcançar a saliva. Este pode ser um dos motivos de alguns estudos que avaliaram estresse não terem encontrado correlação entre α -amilase e cortisol salivar (Granger et al., 2007).

Outro forte ativador do SNS capaz de alterar as concentrações de α -amilase na saliva é o exercício físico. Vários estudos têm mostrado elevações na concentração de α -amilase salivar durante e após exercício comparado aos valores basais (Chicharro et al., 1998; Walsh et al., 1999; de Oliveira et al., 2010). Nesse contexto, Calvo et al.

(1997) propuseram a utilização da α -amilase salivar como indicador do limiar anaeróbico em exercício incremental realizado em esteira.

A enzima α -amilase é produzida pela glândula salivar juntamente com outros componentes da saliva, portanto todos os fatores que estimulam a salivação podem influenciar a secreção de α -amilase (Rohleder & Nater, 2009). Ou seja, para a utilização da enzima α -amilase na saliva principalmente em estudos longitudinais é importante considerar que esta enzima sofre variação circadiana ao longo do dia (Nater et al., 2007), devendo seguir um protocolo bem definido em todos os momentos de análise.

4.2. Compostos inorgânicos

A saliva contém principalmente água e íons fortes e fracos (Na^+ , K^+ , Mg^+ , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_3^{2-}), que podem atuar como agentes tamponantes. As concentrações de eletrólitos na saliva são facilmente mensuradas por técnicas comumente aplicadas em química clínica como fotometria de chama e eletrodo íon seletivo, tornando viável a utilização destas análises na rotina laboratorial. Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que eletrólitos na saliva não possuem correspondência no plasma (Rehak et al., 2000).

A concentração de K^+ na saliva está bem acima dos valores observados no plasma. De modo contrário, a concentração de Na^+ neste fluído é menor em relação ao plasma (Aps & Martens, 2005). Isso ocorre provavelmente devido à presença de receptores nas células do ducto das glândulas salivares que são responsivos a mineralocorticoides, como por exemplo, a aldosterona (Booth et al., 2002) ou a medicamentos (Chicharro et al., 1998).

Tabela 2. Comparação de eletrólitos mensurados na saliva e plasma.

Analito	Método Coleta	n	Material Absorvente	[] Salivar ^(a)	[] Plasmática ^(a)	Método
Na ⁺ (mmol/L)	SP	60	Tubo Plástico	3,0 - 29,0	136,0 - 145,0	FC
K ⁺ (mmol/L)	SP	60	Tubo Plástico	6,4 – 36,6	3,5 - 4,5	ISE
Ca ²⁺ (mmol/L)	SP	60	Tubo Plástico	0,88 – 2,5	1,15 – 1,33	ISE
Cl ⁻ (mmol/L)	SP	60	Tubo Plástico	0 - 27	98 - 107	ISE

^(a) Intervalo de referência (percentil 2,5 e 97,5); [] = Concentração; Na⁺ = Sódio; K⁺ = Potássio; Ca²⁺ = Cálcio; Cl⁻ = Cloreto; SP = Salivação Passiva; FC = Fotometria de Chama; ISE= Eletrodo Íon Seletivo. Dados compilados da referência: Rehak et al. (2000).

O exercício físico de duração e intensidade variada pode alterar a concentração iônica da saliva, principalmente Na⁺ e K⁺ (Chicharro et al., 1998). Em um trabalho anterior esses autores propuseram que as concentrações salivares de Na⁺, K⁺ e Cl⁻ poderiam apresentar uma relação com o limiar anaeróbico de lactato durante teste incremental em ciclo ergômetro (Chicharro et al., 1994). Essas alterações nas concentrações de eletrólitos salivares que ocorrem em determinadas intensidades do exercício foram creditadas à estimulação simpática, que induz mudanças no fluxo salivar, na reabsorção e secreção de eletrólitos nas células secretórias (Chicharro et al., 1998).

4.3. Compostos orgânicos não proteicos

Alguns compostos orgânicos não proteicos podem ser encontrados em baixas concentrações na saliva. Eles executam diferentes funções, e são em sua maioria originários do plasma através de ultrafiltração; ou podem acidentalmente estar presentes devido à contaminação com sangue proveniente de lesões na mucosa oral. Assim, quantidades negligenciáveis de bilirrubina, creatinina, glicose, colesterol e triacilgliceróis podem ser encontradas na saliva de indivíduos saudáveis (Rehak et al., 2000).

Já as concentrações de uréia (2,9 – 6,8 mmol/L) e ácido úrico (0,04 – 0,36 mmol/L) na saliva apresentam concentrações similares às encontradas no sangue (Rehak et al., 2000), e respondem a alterações metabólicas provenientes de patologias como disfunção renal e gota. Foi mostrado que em indivíduos que apresentam comprometimento renal as concentrações salivares de uréia podem subir drasticamente (6,1 - 29,6 mmol/L), acompanhando os valores séricos (Cardoso et al., 2009). Em atletas a dosagem de uréia pode ser utilizada para monitoramento do metabolismo proteico (Lac & Maso, 2004).

O ácido úrico é o principal antioxidante presente na saliva e contribui com aproximadamente 70% da capacidade antioxidante total (Nagler et al., 2002; Diab-Ladki et al., 2003). Sua quantificação tem sido utilizada no monitoramento dos efeitos da hemodiálise (Blicharz et al., 2008) e na avaliação de pacientes com gota (Owen-Smith et al., 1998). O exercício agudo seja ele resistido ou aeróbico promove aumentos nos valores salivares de ácido úrico (Gonzalez et al., 2008; Owen-Smith et al., 1998) e capacidade antioxidante total quando comparados aos valores basais (Gonzalez et al.,

2008). No entanto, Youssef et al. (2008) mostraram que a capacidade antioxidante total salivar de triatletas caiu significativamente no final de temporada quando os valores foram comparados ao início do período de treinamento. Outras moléculas orgânicas importantes como ácido ascórbico e vitamina E compõe o sistema de defesa antioxidante da saliva (Nagler et al., 2002).

Outro composto importante para aplicação no esporte é o lactato. Alguns estudos analisaram a resposta do lactato salivar ao exercício físico, na tentativa de determinar a intensidade do treino (Ohkuwa et al., 1995; Chicharro et al., 1998) ou testar a correlação entre os valores de lactato sanguíneo e salivar (Santos et al., 2006). Nenhuma mudança foi observada nos valores de lactato salivar em exercício aeróbico comparado ao repouso. Estudos pilotos realizados em nosso laboratório sobre a cinética da resposta do lactato no sangue e saliva em fundistas após teste de esforço máximo em esteira mostraram que o pico de lactato salivar aconteceu tardiamente à resposta do sangue. Também não detectamos correlação entre lactato salivar com lactato sanguíneo ou α -amilase salivar (*resultados não publicados*). Porém mais estudos que utilizem diferentes protocolos de exercício, métodos de coleta e maior número de atletas são necessários para avaliar o potencial de utilização do lactato salivar.

4.4. Hormônios

A maioria dos hormônios presentes no plasma pode ser quantificada na saliva devido a uma conexão entre as concentrações plasmáticas e as glândulas salivares, possibilitando uma aplicação clínica (Chiappin et al., 2007). A principal via de entrada

dos hormônios esteróides e outras moléculas pequenas e neutras na saliva é a difusão passiva. As glândulas salivares são densamente irrigadas por redes de capilares e muitos dos componentes sanguíneos lipossolúveis ultrapassam facilmente a parede dos capilares para o interior das glândulas salivares (Gröschl, 2008).

Proteínas séricas e globulinas que se ligam aos hormônios são moléculas muito grandes para ultrapassar as membranas celulares das glândulas salivares. Por este motivo, somente hormônios não ligados (fração livre) presentes no plasma podem se difundir para a saliva. Assim, os hormônios esteróides lipossolúveis não conjugados (tais como cortisol, estriol, progesterona e testosterona) difundem-se predominantemente via intracelular, não sofrem influência do fluxo salivar e apresentam concentrações muito próximas da fração plasmática livre.

Por outro lado, esteróides eletricamente carregados ou conjugados com proteínas são capazes de entrar apenas em pequenas quantidades, através das junções comunicantes entre as células da glândula salivar. Como este processo é muito lento, estes hormônios tendem a ter seus valores fortemente afetados pelo fluxo salivar, apresentando concentrações muito menores em relação ao plasma (Vining et al., 1983). É importante ressaltar que essas análises podem sofrer interferências devido à presença de contaminação com sangue. Pequenas quantidades de sangue, originados de lesões na mucosa oral e gengivas, podem provocar falsas elevações nas concentrações de analitos salivares (Schwartz & Granger, 2004).

O cortisol é um hormônio produzido e liberado pelas glândulas adrenais na circulação. Ele possui importantes funções metabólicas, tais como controle da pressão

arterial, função cardiovascular e sistema imune (Sapolsky et al., 2000). Nos tecidos periféricos o cortisol estimula a lipólise em células adiposas, aumenta a degradação de proteínas e diminui a síntese proteica em células musculares, resultando em maior liberação de lipídeos e aminoácidos na circulação (Kraemer & Ratamess, 2005). A secreção deste hormônio sofre variação circadiana, com concentrações mais elevadas na manhã e decréscimo à tarde (Nater et al., 2007). Alguns trabalhos mostraram que a fração livre do cortisol plasmático se correlaciona com as concentrações salivares (Vining et al., 1983; Lippi et al., 2009), tornando este marcador útil na avaliação das respostas ao estresse físico e psicológico (Sapolsky et al., 2000).

A atividade física provoca alterações na secreção de cortisol que podem se refletir na fração salivar livre. O exercício físico é capaz de aumentar de forma aguda a concentração de cortisol salivar em atletas submetidos a diferentes tipos de treinos ou competição (Aubets & Segura, 1995). Além de avaliar as respostas adaptativas ao treinamento, o cortisol pode ser um biomarcador interessante para investigar os estados de tolerância e intolerância ao treino quando realizado em conjunto com a dosagem de testosterona e posterior cálculo da razão testosterona:cortisol (Urhausen & Kindermann, 2002; Halson & Jeukendrup, 2004).

Apesar da comodidade da aplicação do cortisol salivar para avaliar atletas e pacientes com patologias que causem distúrbio na secreção de corticosteróides, é necessário cuidado na interpretação dos dados obtidos com saliva, pois poucos estudos estabelecem valores de referência para o cortisol salivar considerando a variação circadiana e seguindo o protocolo da Federação Internacional de Química

Clínica (IFCC) que adota entre outras recomendações o número mínimo de 120 sujeitos para estimar o intervalo (Patel et al., 2004).

Outros hormônios androgênicos sintéticos ou naturais que são utilizados com o intuito de melhorar o desempenho podem se difundir de maneira passiva para o fluído oral (Vining et al., 1983). Embora seja possível quantificar testosterona, epitestosterona, tetrahydrogestrinona e outros hormônios utilizados com fins ilícitos por atletas, a Agência Mundial Anti Doping (WADA) não oferece nenhuma informação sobre o uso de saliva na detecção e controle do doping (Gröschl, 2008).

5. Métodos de Coleta de Saliva

A saliva pode ser facilmente coletada pelo próprio indivíduo através do método de salivação passiva, diretamente em frascos plásticos coletores simples (saliva não estimulada). A coleta passiva é a mais recomendada, pois a maioria dos analitos pode ser quantificada sem sofrer interferências e o possui um custo relativamente baixo para sua obtenção. Porém, o volume fornecido neste caso é pequeno. Outra maneira de coleta consiste em cuspir diretamente em um frasco coletor. Neste caso, a probabilidade de contaminação bacteriana é maior e pode prejudicar as análises após o período de armazenamento (Chiappin et al., 2007).

Não se recomenda a escovação dos dentes antes da coleta, nem ingerir alimentos e líquidos (exceto água) por pelo menos 30 minutos antes da coleta. A limpeza da boca através da aplicação de água (preferivelmente destilada) ajuda a eliminar resíduos que podem interferir nas análises (Chiappin et al., 2007).

A saliva estimulada pode ser coletada através de ação mastigatória (mastigação de Parafilm®) ou estimulação gustatória, pela utilização de ácido cítrico (Kaufman & Lamster, 2002). Existem vários dispositivos comercializados com o intuito de facilitar a coleta de saliva. Eles utilizam em sua maioria uma base sólida, composta geralmente por um pequeno pedaço de algodão ou poliéster para a retenção da saliva e um tubo cônico para centrifugação do líquido coletado. Dentre os sistemas mais comuns no mercado que utilizam base sólida estão:

- ✓ *Salimetrics Oral Swab* (SOS): Comercializado pela Salimetrics® LLC, é composto de um pequeno cilindro de polímero inerte, semelhante a algodão. Este cilindro é colocado na boca do indivíduo de 2-5 minutos e umedecido com saliva, depois transferido para um tubo cônico que é centrifugado.
- ✓ *Salivette®*: Comercializado pela Sarstedt, Newton, NC, constituído de um cilindro de algodão, poliéster ou polietileno (geralmente contendo ácido cítrico para estimulação) que é colocado na boca e mastigado por 1 minuto. Após este tempo o algodão é colocado dentro de um tubo cônico para posterior centrifugação. Recentemente o fabricante colocou um novo dispositivo específico para a coleta de saliva utilizada nas dosagens de cortisol denominado: *Cortisol-Salivette®*.
- ✓ *Orapette*: Comercializado por Trinity Biotech, Dublin, Irlanda, é composto de uma bola de algodão. O algodão é colocado na boca até estar completamente saturado com saliva. O algodão saturado é transferido para um recipiente plástico com furo que é pressionado para recolher o fluido coletado em recipiente para transporte e armazenamento (Hodinka et al., 1998).

Um inconveniente comum a todos os sistemas de coleta citados acima é que eles não permitem a quantificação do volume de forma direta e precisa. Além disso, a recuperação da saliva e analitos podem variar consideravelmente em cada método, principalmente devido a possibilidade dos analitos ficarem aderidos ao algodão, ocasionando valores falsamente diminuídos (Michishige et al., 2006; Gröschl, 2008, DeCaro, 2008).

Outro sistema de coleta disponível no mercado é o *Saliva Collection System* (SCS)[®] (Greiner Bio-One, GmgH, Kremsmuenster, Áustria), que utiliza uma solução tamponada a base de ácido cítrico para coleta de saliva. Este sistema de coleta é mais elaborado e possui uma solução para limpeza da cavidade oral e uniformização das condições de coleta. Após a aplicação da solução de limpeza o indivíduo coloca a solução de extração na boca por 2 minutos e a seguir dispensa toda solução em um béquer. A saliva coletada (saliva + solução de extração) é então transferida para tubos de transporte graduados que permitem quantificar o volume total de solução coletada (Raggam et al., 2008a).

Este sistema de coleta de saliva foi recentemente testado e demonstrou resultados confiáveis e reprodutíveis para quantificação de cálcio e magnésio (Raggam et al., 2008a), α -amilase, IgA, drogas terapêuticas (Gröschl et al., 2008) e cortisol na saliva através de métodos laboratoriais de rotina (Wagner et al., 2009).

No entanto, alguns analitos podem sofrer interferência devido ao pH e aditivos presentes na solução de extração. Outros estudos são necessários para verificar quais analitos podem ser quantificados sem interferência do sistema de coleta em base

líquida. Em comparação aos demais sistemas em base líquida o SCS necessita de maior cuidado ao realizar a coleta para que não haja troca das soluções de lavagem e extração, além de possuir um custo bem mais elevado (Gröschl et al., 2008).

6. Interferentes pré-analíticos e analíticos nas análises de saliva

Um dos interferentes pré-analíticos mais importantes a ser considerado é a necessidade de quantificação do tempo e o volume de saliva coletada para estimar a taxa de secreção salivar. A velocidade de passagem da saliva através dos ductos salivares determinará, por exemplo, a concentração de eletrólitos. Alguns componentes salivares como IgA e dehidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S) são dependentes do fluxo salivar, necessitando de correção pelo volume e tempo de coleta (Vining et al., 1983; Aps & Martens, 2005). O aumento do fluxo salivar através de estimulação artificial pode alterar a constituição iônica, aumentando concentrações de Na^+ , Cl^- e HCO_3^- e diminuindo o K^+ salivar (Aps & Martens, 2005).

A utilização de ácido cítrico e goma de mascar (Tridente®) como estimulantes e materiais a base de algodão ou poliéster na coleta podem elevar falsamente os valores de testosterona salivar (Granger et al., 2004). Não se recomenda a utilização dos coletores a base de algodão para a análise de hormônios devido à possibilidade de interferências na realização dos imunoenaios (Gröschl, 2008). O algodão pode se ligar ao cortisol e dehidroepiandrosterona (DHEA) e provocar falsa diminuição (Hansen et al., 2003; Gallagher et al., 2006).

Além da escolha do sistema de coleta adequado, a coleta de saliva deve seguir um protocolo detalhado para evitar interpretações equivocadas. O horário de coleta deve ser sempre padronizado e respeitado. Hormônios e outros constituintes na saliva podem apresentar variações circadianas importantes, que justificam momentos de coleta pré-estabelecidos.

Tabela 3. Concentrações salivares de cortisol livre (nmol/L) em diferentes momentos de coleta.

Método Coleta	Material Absorvente	Concentração Salivar	n	Observações	Referências
SP	Frascos de Poliestireno	10,9 - 40,3 ^(a)	128	Coleta (6:00 - 8:00h) Método RIE.	Patel et al.(2004)
SE	Algodão, Salivette®	3,57 - 35,1 ^(a)	120	Coleta (5:30 - 7:30h) Método RIE.	Hansen et al. (2003)
SE	Algodão, Salivette®	7,61 - 39,4 ^(a)	119	Coleta 20 min após acordar; Método RIE.	Hansen et al. (2003)
SE	Algodão, Salivette®	1,14 - 10,3 ^(a)	96	Coleta (18:00h) Método RIE.	Hansen et al. (2003)
SE	Poliéster, Salivette®	<3,0 ^(b)	65	Coleta (23:00-24:00h) Método LC-MS	Turpeinen et al. (2009)

^(a) Intervalo de referência (percentil 2,5 e 97,5); ^(b) Limite superior (percentil 95); SP = Salivação Passiva; SE = Salivação Estimulada; LC-MS = Espectrometria de massas em tandem-cromatografia líquida.

Diferentes estudos mostraram que análises de cortisol na saliva se alteram de acordo com o horário de coleta, conforme apresentado na Tabela 3, com valores mais elevados pela manhã e diminuídos à tarde e noite (Garcia et al., 2008; Hansen et al.,

2008). É importante ressaltar que a α -amilase salivar apresenta variação diurna inversa ao cortisol e sofre influência da taxa de secreção salivar, portanto a correção da atividade de α -amilase por unidade de tempo é uma medida útil para padronizar a expressão de resultados (Nater et al., 2007). A ingestão de álcool, cafeína e dietas ricas em proteínas pode alterar os níveis de cortisol e α -amilase na saliva (Hansen et al., 2008). Além disso, a α -amilase pode sofrer interferências quando o método de coleta inclui ação mastigatória (Rohleder & Nater, 2009).

Outro cuidado importante é que as amostras de saliva devem ser conservadas sob-refrigeração (4°C) se forem processadas entre 3 a 6 horas após a coleta. Quando necessário armazenar por longo período, conservar em temperatura de -80 °C para evitar o crescimento bacteriano (Rohleder & Nater, 2009). O cortisol salivar é estável a 5°C por três meses e até um ano armazenado entre -20 °C a -80 °C. Repetidos ciclos de congelamento e descongelamento parecem não afetar as concentrações de cortisol (Hansen et al. 2008). A adição de azida de sódio na saliva pode inibir o crescimento bacteriano e preservar a amostra, porém imunoenaios que utilizam peroxidase de raiz forte podem sofrer interferência (Chiappin et al., 2007).

7. Considerações Finais

A aplicação clínica de analitos quantificados em saliva apresenta grande potencial de crescimento, mas para isso ainda é necessário padronizar algumas variáveis pré-analíticas tais como o sistema de coleta, levando-se em consideração o analito a ser quantificado; horários de coleta; quantificação direta de volume; recuperação de amostra e evitar contaminação da saliva com sangue proveniente de lesões da mucosa oral.

A falta de correlação entre alguns analitos presentes na saliva e sangue não invalida a possibilidade de utilização da saliva como ferramenta diagnóstica, mas impõe o estabelecimento de intervalos de referência e componentes de variação biológica para as análises realizadas em saliva através de metodologias tradicionais e, em alguns casos, com pequenas modificações nas técnicas que as tornem mais sensíveis.

CAPÍTULO 4

INTERVALOS DE REFERÊNCIA PARA ANALITOS EM SALIVA DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE ATIVOS

Versão em português do artigo original “Reference intervals for oral fluid analytes collected by a standardised method in physically active subjects” submetido ao periódico: *Clinica Chimica Acta*

Intervalos de referência para analitos em saliva de indivíduos fisicamente ativos

Lázaro Alessandro S. Nunes¹, René Brenzikofer², Denise Vaz de Macedo¹

1. Laboratório de Bioquímica do Exercício - LABEX, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas – Unicamp, Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n, Barão Geraldo, CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

2. Laboratório de Instrumentação em Biomecânica, Faculdade de Educação Física, Universidade de Campinas - Unicamp, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

Introdução: A saliva apresenta algumas vantagens como alternativa ao sangue na patologia clínica ou monitoramento de atletas. Ela pode ser coletada de forma não invasiva e sem treinamento específico. Entretanto, o método de coleta deve ser padronizado e intervalos de referência específicos devem ser estabelecidos para a correta aplicação e interpretação dos resultados. Os objetivos deste estudo foram: testar um sistema de coleta de saliva em base líquida para determinar a capacidade antioxidante (TAS), ácido úrico (AU), proteínas totais (PT) e atividade da alfa-amilase salivar (AAS); determinar possíveis correlações entre estes analitos na saliva e sangue; estabelecer intervalos de referência para estes parâmetros em saliva coletada de indivíduos fisicamente ativos. **Material e Métodos:** Participaram deste estudo 115 sujeitos (18-20 anos), após 3 meses de treinamento de *endurance*. As amostras de saliva foram coletadas usando o *Saliva Collection System* (Greiner Bio-One®), imediatamente antes da coleta da amostra de sangue. As concentrações de PT, AU, TAS e atividade da AAS, foram analisadas no equipamento automatizado Autolab Boehringer. Refval software foi utilizado para calcular os intervalos de referência. **Resultados:** Encontramos correlação fraca entre AU e PT na saliva e sangue ($r = 0,341$ e $r = 0,212$, respectivamente). O intervalo de referência para PT (0,17 - 1,50 g/L) e atividade da AAS (5,0 - 155,4 U/mL) no período da manhã, foram menores em relação ao período da tarde (0,18 - 5,30 g/L e 24 - 368 U/mL, respectivamente, $p < 0,0001$). O intervalo de referência para AU (0,07 - 0,32 mmol/L) e TAS (42,5 - 406,8 $\mu\text{mol Trolox eq/L}$) não variou em função do momento de coleta. **Conclusão:** Os resultados apresentados nesse estudo aumentam o potencial diagnóstico desses analitos na saliva, e permitem a detecção de alterações fisiológicas ou patológicas individuais relacionadas aos mesmos.

Palavras Chaves: Saliva, Valor de referência, Capacidade antioxidante, treinamento.

ABSTRACT

Oral fluid presents some advantages as a substitute for blood in clinical pathology or athletic monitoring. It can be obtained non-invasively and without training. However, the collection method should be standardised and specific reference intervals established to ensure correct applications and interpretations. The aims of this study were to test a liquid-based saliva collection system for total antioxidant status (TAS), uric acid (UA), total protein concentration and salivary alpha-amylase activity (SAA) analyses to determine any correlation between these analytes in serum and oral fluid from physically active subjects and to establish reference intervals for these oral fluid parameters. For our study, we analysed 115 subjects (18-20 years old) after 3 months of endurance training. Oral fluid samples were collected using the Saliva Collection System (Greiner Bio-One®) immediately before obtaining blood samples. Total protein concentrations, SAA, UA and TAS were measured using an Autolab Boehringer analyser. RefVal software was used to calculate reference intervals. We found weak correlation between UA and total protein concentration in the serum and oral fluid samples ($r=0.341$ and $r=0.212$, respectively). The reference interval for total protein concentrations (0.17-1.50 g/L) and SAA activity (5.0-155.4 U/mL) in the morning were lower than in the afternoon (0.18-5.30 g/L and 24.0-368.0 U/mL, respectively, $p<0.0001$). The reference interval for UA (0.07-0.32 mmol/L) and TAS (42.5-406.8 $\mu\text{mol Trolox eq/L}$) did not vary significantly with time collection. Our results increase the diagnosis potential of these analyses and allow the detection of physiological or pathological states related to these analytes when individual values change in relation to this well-defined reference group.

Key Words: Saliva, Reference value, Antioxidant capacity, Athletic monitoring.

INTRODUÇÃO

O acompanhamento de parâmetros bioquímicos e hematológicos no sangue pode ser uma metodologia valiosa para avaliar os limiares de esforço físico dos atletas durante uma temporada competitiva. Essas avaliações, entretanto, exigem frequentes e sucessivas coletas de sangue, que são normalmente realizadas por punção venosa, um procedimento estressante para muitos indivíduos (Nunes et al., 2006). A saliva apresenta vantagens como substituta do sangue para o diagnóstico e acompanhamento dos diferentes estados metabólicos. Pode ser coletada facilmente por métodos não invasivos, e não requer um especialista treinado (Kaufman & Lamster, 2002).

No entanto, algumas condições para o uso correto da saliva em patologia clínica devem ser observadas: o método de coleta deve permitir a quantificação do volume de saliva coletado com mínimas perdas de recuperação, e intervalos de referência para análises bioquímicas em saliva devem ser estabelecidos.

Os objetivos deste trabalho foram: 1) mensurar a capacidade antioxidante total, ácido úrico, alfa-amilase salivar e concentração de proteínas totais em saliva coletada através de um sistema de coleta de saliva em base líquida 2) determinar possíveis correlações destes analitos em saliva e sangue; 3) estabelecer intervalos de referência para estes analitos na saliva de sujeitos fisicamente ativos.

MATERIAL E METODOS

Variação analítica e análises bioquímicas em amostras artificiais de saliva

Para quantificar a variação analítica e o erro sistemático nas análises bioquímicas, foi utilizada saliva artificial preservada e solução de extração de saliva (SES) fornecida no kit de quantificação de saliva (SQK) (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmuenster, Austria). Foi preparada amostra de saliva artificial contendo concentrações conhecidas de material de referência para os seguintes analitos: ácido úrico (AU), proteínas totais (PT) e alfa-amilase (E.C. 3.2.1.1), proveniente de saliva humana Tipo XIII-A (pó liofilizado, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA).

A capacidade antioxidante foi testada através de amostra de saliva artificial contendo concentrações conhecidas de TroloxTM (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA).

A alfa-amilase liofilizada foi diluída em CaCl₂ (1 mM) e sua atividade foi mensurada com o kit Amilase 405 AA (Wiener Lab, Rosario, Argentina). A solução pura de alfa-amilase foi diluída 10 vezes em saliva artificial; esta solução foi diluída novamente (1:10) em SES para simular o efeito da solução de extração sobre a alfa-amilase. Todas as amostras de saliva artificial foram ensaiadas imediatamente após a preparação e separadas em alíquotas, que foram posteriormente armazenadas a -20°C para análises posteriores.

Os valores esperados para as amostras de saliva estão mostrados na Tabela 1, apresentada na Seção Resultados. Para estimar a variação intra-ensaio, analisamos

cada amostra de saliva 20 vezes, e calculamos o coeficiente de variação analítica intra-ensaio (CV_{AI}) usando a média e o desvio padrão das 20 análises.

A estabilidade e a variação analítica inter-ensaio foi estimada durante 8 semanas em 24 dias diferentes, exceto para alfa-amilase que foi ensaiada durante 2 semanas. O coeficiente de variação inter-ensaio (CV_{AB}) foi calculado utilizando-se a média e desvio padrão de 40 medidas.

As análises bioquímicas foram realizadas no equipamento Autolab (Boehringer) com kits comerciais e incluíram AU, concentração de PT e atividade da alfa amilase salivar (AAS) (Wiener Lab[®]; Rosário, Argentina). Todos os analitos foram quantificados dentro da faixa de detecção e linearidade fornecida pelo fabricante do kit. A capacidade antioxidante (TAS) foi determinada *no equipamento* Autolab (Boehringer) através da técnica do FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) (Benzie & Strain, 1996), e os resultados expressos em $\mu\text{mol Trolox equivalentes/L}$.

O controle interno foi realizado em paralelo as análises, com a utilização de soro controle comercial (Wiener lab Standatrol SE 2). Os controles de saliva (1 e 2) fornecidos no SQK foram usados para garantir a determinação acurada do conteúdo de saliva. Para minimizar as variações analíticas, todas as amostras foram testadas pelo mesmo profissional sem a mudança nos lotes de reagentes, padrões ou materiais de controle.

Sujeitos

Este estudo incluiu 115 sujeitos (sexo masculino), idade = 19 ± 1 anos, após 3 meses de treinamento de *endurance*. Todos os sujeitos estavam no primeiro estágio de

preparação educacional e física para o ingresso na carreira militar, que realizaram 3 h de atividade física diária, constituindo assim um bom grupo controle de indivíduos fisicamente ativos. O treinamento teve predomínio de atividades aeróbicas (alto volume e baixa intensidade) tais como corrida e natação, 5 dias por semana, seguido de dois dias de descanso. Os sujeitos forneceram consentimento formal por escrito para a participação na pesquisa. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Faculdade de Ciências Médicas (FCM)/Unicamp (CAAE: 0200.0.146.000-08) – Anexo 1.

Amostras de sangue

Todas as amostras foram coletadas após dois dias sem atividade física, para evitar as variações hemodinâmicas e hemodiluição aguda induzidas pelo exercício (Sawka et al., 2000). As amostras de sangue foram coletas em condições padronizadas: 8 mL de sangue em tubos Vacuette[®] (Greiner Bio-one) com gel separador para obtenção do soro utilizado nas análises bioquímicas. As amostras de sangue foram coletadas pela manhã após jejum de 12 horas, transportadas a 4° C para o laboratório dentro de 30 minutos, e processados em centrífuga refrigerada a 1800 *g* por 10 minutos. As amostras de soro foram analisadas imediatamente após centrifugação.

Amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas dos sujeitos fisicamente ativos ($n=115$) *imediatamente antes da coleta de sangue através do Saliva Collection System (SCS)*

(Greiner Bio-One GmbH, Kremsmüenter, Austria), de acordo com as instruções do fabricante e trabalhos prévios (Raggam et al., 2008b).

Para estabelecer os intervalos de referência em saliva (IRS) e verificar a influência do ciclo circadiano sob os analitos salivares foram coletadas amostras de saliva dos mesmos sujeitos em dois momentos: manhã: (06:30 h, n=115) e tarde (16:00 h, n=115). Inicialmente, a solução de limpeza (27 mmol/L tampão citrico pH 7,0) foi usada para limpeza da cavidade oral. A seguir, os sujeitos permaneceram por dois minutos com 4 mL da solução de extração de saliva em sua boca (SES: 39 mmol/L citric buffer, pH 4,2 e tartrazina, corante alimentício solúvel em água).

A solução (SES + saliva) foi coletada em béquer plástico e depois transferida para dois tubos de centrifugação graduados com solução conservante. As amostras de saliva foram centrifugadas a 2200g por 10 minutos sob-refrigeração de 4°C e analisadas simultaneamente com as dosagens no soro. As amostras de saliva coletadas através do SCS contém tartrazina como padrão interno. A concentração de tartrazina foi determinada fotometricamente a 450 nm e o volume exato de saliva foi obtido (vol.-%) comparando-se aos padrões internos fornecidos no SQK (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmüenter, Austria). Os tubos graduados permitiram quantificar o volume de saliva coletada (Raggam et al., 2008b).

Análises estatísticas

A variação analítica (intra e inter-ensaio) foi estimada pelo cálculo do coeficiente de variação originário da saliva artificial preparada (Tabela 1). O coeficiente de correlação de Spearman (r) entre saliva e soro está apresentado no texto. O teste-t

pareado para amostras não paramétricas foi usado para testar a diferença entre a média dos valores de saliva coletada na manhã e tarde. O histograma da atividade da AAS e concentração de proteínas totais foram plotadas em escala logarítmica. As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad InStat 3, e os gráficos feitos em Matlab® 7.0 software. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Cálculo dos Intervalos de Referência

Para estabelecer os intervalos de referência para AU, concentração de PT, TAS e atividade da AAS foram utilizadas 115 amostras de saliva de indivíduos fisicamente ativos. Foram seguidos os critérios da Federação Internacional de Química Clínica (FIQC) (Solberg, 1987). O algoritmo de Horn foi aplicado para detectar e remover os *outliers* (Solberg, 1987, Horn et al., 2001). O programa RefVal (Solberg, 2004), recomendado pela FIQC, foi utilizado para estimar os percentis 2,5 e 97,5, juntamente com os intervalos de confiança (IC) pela metodologia de Bootstrap (Solberg, 2004).

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os valores esperados e os quantificados nas amostras de saliva artificial preparadas, além da variação analítica (intra- e entre-ensaio).

O ácido úrico apresentou o menor coeficiente de variação intra e inter-ensaio comparado aos outros analitos.

Tabela 1. Variação analítica de parâmetros bioquímicos em saliva artificial.

		Variação intra-ensaio			Variação inter-ensaio		
Analitos	Valores esperados	Valores quantificados ^a	CV _{AI} (%)	n	Valores quantificados ^a	CV _{AB} (%)	n
TAS (μ mol Trolox eq/L)	1092	1082,7 $\pm$ 52,7	4,9	20	1091,0 $\pm$ 58,3	5,3	40
AU (mmol/L)	0,069	0,068 $\pm$ 0,001	1,6	20	0,064 $\pm$ 0,002	3,1	40
PT (g/L)	0,42	0,41 $\pm$ 0,012	2,9	20	0,40 $\pm$ 0,027	6,8	40
Atividade AAS (U/mL)	228,2	225,8 $\pm$ 5,7	2,5	20	214,9 $\pm$ 12,5	5,8	40

^a média $\pm$ desvio padrão (DP). CV (%) = média/DP*100. CV_{AI} = coeficiente de variação intra-ensaio. CV_{AB} = coeficiente de variação inter-ensaio.

O volume médio de saliva coletada (SES + saliva) pelos participantes foi 6,5mL (mínimo de 5,0 mL e máximo de 7,0mL). A concentração de saliva na solução, determinada através do padrão interno de tartrazina variou de 24 a 74% v/v (média de 61,6%). Os valores nominais da saliva controle 1 (30 $\pm$ 2 U/mL; n=20) e saliva controle 2 (69 $\pm$ 1 U/mL; n=20), fornecidas no SQK estavam dentro dos valores esperados.

O ácido úrico ($r=0,341$; $p=0,0002$) e PT ($r=0,212$; $p=0,027$) mostraram correlação fraca entre amostras de saliva e soro. Não houve correlação entre saliva e soro para TAS pela metodologia FRAP ($p=0,4744$).

A média e desvio padrão da concentração de proteínas totais na saliva (0,60 $\pm$ 0,75 g/L) e atividade da AAS (44,5 $\pm$ 47,7 U/mL) no período da manhã foram menores que aquelas coletadas à tarde (1,36 $\pm$ 1,32 g/L and 123,6 $\pm$ 82, U/mL, respectivamente, $p<0,0001$), indicando influência do ciclo circadiano nestes analitos. O volume médio de saliva coletada não variou de acordo com o momento de coleta (06:30 h = 6,1 $\pm$ 0,4 mL versus 16:00 h = 6,2 $\pm$ 0,5 mL). A atividade da AAS mostrou melhor correlação com a

concentração de PT na saliva no período da manhã ($r=0,5825$; $p<0,0001$) que no período da tarde ($r=0,2681$; $p=0,0082$).

A concentração de AU ($AU_{6:30\text{ h}} = 0,16 \pm 0,06$ mmol/L e $AU_{16:00\text{ h}} = 0,17 \pm 0,06$ mmol/L, $p=0,2393$) e TAS ($TAS_{6:30\text{ h}} = 198,03 \pm 86,1$ $\mu\text{mol Trolox equivalentes/L}$ e $TAS_{16:00\text{ h}} = 195,7 \pm 82,9$ $\mu\text{mol Trolox equivalentes/L}$, $p=0,4552$) na saliva não foram influenciadas pelo ciclo circadiano.

A Figura 1 mostra a frequência da atividade de AAS coletada no período da manhã e tarde (Fig. 1A) e concentração de PT no período da manhã e tarde (Fig. 1B) em escala logarítmica.

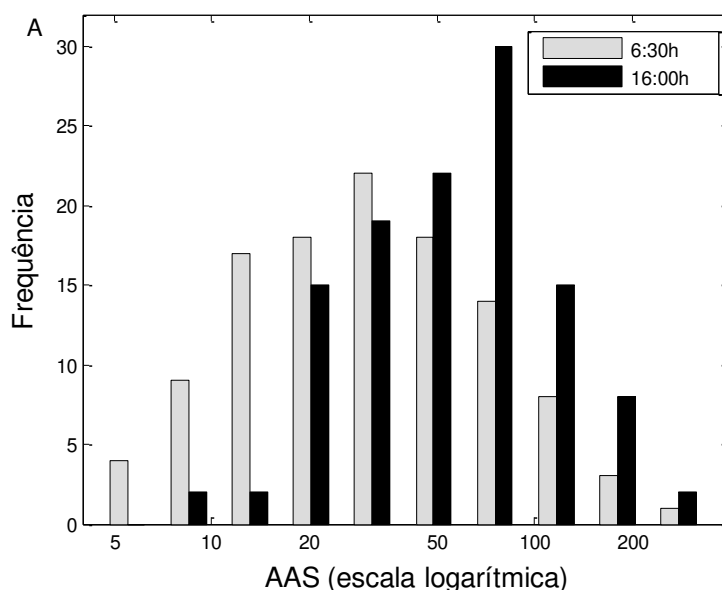


Figura 1A. Frequência da atividade de AAS coletada no período da manhã (06:30 h) e tarde (16:00 h), em escala logarítmica.

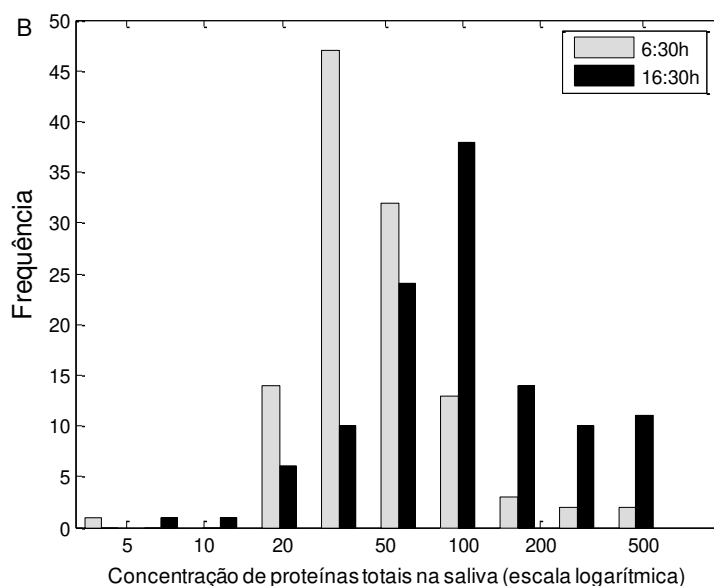


Figura 1B. Frequência da concentração salivar de proteínas totais coletadas no período da manhã (06:30 h) e tarde (16:00 h), em escala logarítmica.

Os dados mostrados na Figura 1 (A e B) sugerem a necessidade de estratificação dos intervalos de referência para amostras coletadas no período da manhã e tarde.

A Tabela 2 mostra o número total de sujeitos para cada análise e inclui o número e valores dos *outliers* excluídos pelo critério de Horn (2001).

Tabela 2. Número total de sujeitos fisicamente ativos e *outliers* excluídos para análises bioquímicas em saliva.

Análises	Número total de sujeitos	Número de <i>Outliers</i>	Valores excluídos	Número final de sujeitos
Atividade AAS (U/mL)				
06:30 h	114	01	347,3	113
16:00 h	115	01	12,4	114
PT (g/L)				
06:30 h	114	02	489,9; 566,3	112
16:00 h	115	01	7.8	114
AU (mmol/L)	115	-	-	115
TAS (μ mol Trolox eq/L)	114	-	-	114

A Tabela 3 apresenta os intervalos de referência e confiança para parâmetros bioquímicos em saliva de indivíduos fisicamente ativos no período da manhã e tarde.

Tabela 3 – Intervalos de referência em saliva coletada de indivíduos fisicamente ativos as 06:30h e 16:00h e os respectivos intervalos de confiança.

Análises	IR Percentil	Intervalo de Confiança	
	2,5 – 97,5	Limite inferior (2,5)	Limite superior (97,5)
Atividade AAS (U/mL)			
06:30 h	5,0 – 155,4	4,4 – 7,3	120,4 – 209,3
16:00 h	24,0 – 368,0	16,5 – 32,8	305,2 – 379,7
PT (g/L)			
06:30 h	0,17 – 1,50	0,03 – 0,22	1,10 – 3,46
16:00 h	0,18 – 5,30	0,14 – 0,24	4,53 – 6,11
AU (mmol/L)			
06:30 h	0,07 – 0,32	0,06 – 0,08	0,03 – 0,35
TAS (μ mol Trolox eq/L)			
06:30 h	42,5 – 406,8	25,0 – 58,6	340,0 – 536,0

IR = Intervalo de Referência; Intervalo de Confiança 90 %

DISCUSSÃO

Uma vantagem da utilização do sistema de coleta de saliva em base líquida foi a determinação do conteúdo de saliva através de um padrão interno, permitindo assim a quantificação das concentrações dos analitos independente das alterações no volume de saliva (Raggam et al., 2008b). Medidas incorretas de volume e perdas na recuperação da saliva podem produzir resultados imprecisos (O'Neal et al., 2000). Crouch (2005) mostrou que o volume de saliva coletado com dispositivos de coleta em base sólida varia de 1,69 a 1,86 mL, com recuperação deste volume em torno de 18 a 83%. Esta perda introduz erros consideráveis nas análises (Crouch, 2005).

Comparada ao sangue, a saliva é um fluido hipotônico e contém menores concentrações da maioria dos analitos (Chiappin et al., 2007). Os resultados apresentados com a saliva artificial (Tabela 1) mostraram baixa variação analítica dos analitos nas concentrações similares às da saliva humana. Além disso, o armazenamento da saliva artificial não afetou os constituintes testados aqui.

A quantificação da atividade da AAS tem sido proposta como um indicador de estresse físico e psicológico (Walsh et al., 1999; Nater et al., 2005) por causa de sua correlação significativa com adrenalina e noradrenalina (Chatterton et al., 1996). Vários estudos prévios investigaram os efeitos agudos do exercício físico sobre a AAS (Gilman et al., 1979; Allgrove et al., 2008), mas não existem estudos que avaliaram o efeito crônico do treinamento físico sobre a atividade da AAS em atletas e indivíduos fisicamente ativos em condições padronizadas, que permitissem o cálculo de intervalos de referência.

Nater et al. (2007) mostraram que a atividade da AAS pode ser influenciada pelo ciclo circadiano, com menores valores de atividade na manhã e valores de pico entre 16:00 e 17:00 h (Nater et al. 2007). Em nosso estudo, os valores médios de atividade da AAS e concentração de proteínas totais na saliva de sujeitos fisicamente ativos (Figura 1 A e B) também mostraram variação circadiana, que justificou a adoção de intervalos de referência distintos para ambas as análises (Tabela 3).

O exercício físico está associado com estresse e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Alessio, 1993; Pattwell et al., 2004). Os antioxidantes enzimáticos e de baixo peso molecular (ABPM) minimizam a ação deletéria das EROs. O ácido úrico é o principal antioxidante no plasma e saliva (Lippi et al., 2008). Sua quantificação tem sido indicada para monitorar estados patológicos (Bentur et al., 2003), e avaliar a capacidade antioxidante de atletas após treinamento (Cazzola et al., 2003). Blicharz et al. (2008) propuseram que o AU salivar é um marcador adequado para avaliar a eficiência de pacientes renais dialisados. Owen-Smith et al. (1998) mostraram que o AU salivar pode se elevar em pacientes com gota e após exercício anaeróbico.

Atletas e indivíduos fisicamente ativos possuem capacidade antioxidante (Carlsohn et al., 2008) e concentrações plasmáticas de ácido úrico mais elevadas em relação a não praticantes de atividade física (Finaud et al., 2006). No entanto, nossos resultados mostraram correlação fraca entre ácido úrico sérico e salivar, o que reforça a necessidade de adotar intervalos de referência específicos em saliva para AU.

O sistema antioxidante salivar também é composto por outras moléculas e enzimas, tais como ácido ascórbico, proteínas, vitamina E e peroxidases (Nagler et al.,

2002). Entretanto, a medida individual destes antioxidantes não enzimáticos é menos representativa da capacidade antioxidante total (Cao & Prior, 1999). Neste estudo testamos a capacidade antioxidante da saliva pela técnica FRAP, proposta por Benzie & Strain (1996). Os resultados de TAS na saliva foram menores que os valores séricos, e não apresentaram correlação com soro, como previamente mostrado por Youssef *et al.* (2008), que também não encontraram correlação entre saliva e soro. Os menores valores de TAS na saliva em relação ao soro podem ser devido às menores concentrações de ácido úrico, ácido ascórbico e enzimas antioxidantes na saliva (Moore *et al.*, 1994).

Os resultados apresentados confirmam a necessidade de adoção de intervalos de referência apropriados para os analitos em saliva. Concluímos que o uso da saliva como fluido não invasivo para avaliar o efeito do treinamento em atletas ou avaliação de patologias em laboratório clínico é possível quando métodos de coleta padronizados são utilizados. Os intervalos de referência específicos apresentados neste estudo permitem a detecção de alterações fisiológicas e patológicas relacionadas a estes analitos, e podem aumentar o potencial diagnóstico destas análises.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessio, HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25:218-24.

Allgrove JE, Gomes E, Hough J, et al. Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men. *J Sports Sci.* 2008;26(6):653-61.

Aoi W, Naito Y, Takanami Y, et al. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Rad Biol Med.* 2004;37:480-7.

Aps JK, Martens LC. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int.* 2005;150:119-31.

Aubets J, Segura J. Salivary cortisol as a marker of competition related stress. *Sci Sports.* 1995;10:149-54.

Bagger M, Petersen PH, Pedersen PK. Biological Variation in Variables Associated with Exercise Training. *Int J Sports Med.* 2003;24:433-40.

Banfi G, Del Fabbro M, Lippi G (2009) Serum creatinine concentration and creatinine-based estimation of glomerular filtration rate in athletes. *Sports Med* 39(4):331-7.

Banfi G, Del Fabbro M. Relation between serum creatinine and body mass index in elite athletes of different sport disciplines. *Br J Sports Med.* 2006;40:675–8.

Bangsbo J, Iaia FM, Krstrup P. Metabolic Response and Fatigue in Soccer. *Int J Sports Physiol Perform.* 2007;2:111-27.

Bentur L, Mansour Y, Brik R, et al. Salivary oxidative stress in children during acute asthmatic attack and during remission. *Respir Med.* 2006;100(7):1195-201.

- Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power":The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239:70-6.
- Biosca C, Ricós C, Lauzurica R, et al. Reference change value concept combining two delta values to predict crises in renal post transplantation. *Clin Chem.* 2001;47:2146-8.
- Bishop NC, Gleeson, M. Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. *Front Biosci.* 2009;14:4444-56.
- Blannin AK, Robson PJ, Walsh NP, et al. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. *Int J Sports Med.* 1998;19(8):547-52.
- Blicharz TM, Rissin DM, Bowden M, et al. Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a proof of principle. *Clin Chem.* 2008;54(9):1473-80.
- Booth FW, Lees SJ. Physically Active Subjects Should Be the Control Group. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2006; 38(3):405-6.
- Booth RE, Jhonson JP, Stockand JD. Aldosterone. *Adv Physiol Edu.* 2002;26:8-20.
- Calvo F, Chicharro JL, Bandrés F, et al. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. *Can. J. Appl. Physiol.* 1997;22(6):553-61.
- Cao G, Prior RL. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1173-81.
- Cardoso EML, Arregger AL, Tumilasci OR, et al. Assessment of salivary urea as a less invasive alternative to serum determinations. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(3):330-4.

- Carlsohn A, Rohn S, Bittmann F, et al. Exercise increases the plasma antioxidant capacity of adolescent athletes. *Ann Nutr Metab.* 2008;53:96-103.
- Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, et al. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and oxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest.* 2003;33:924-30.
- Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC, et al. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol.* 1996;16(4):433-48.
- Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, et al. Saliva specimen: A new laboratory tool diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta.* 2007;383:30-40.
- Chicharro JL, Legido JC, Alvarez J, et al. Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. *Eur J Appl Physiol.* 1994;68:1495-7.
- Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, et al. Saliva Composition and Exercise. *Sports Med.* 1998;26(1):17-27.
- Choo RE, Huestis MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(11):1273-1287.
- Convertino VA. Blood volume response to physical activity and inactivity. *Am J Med Sci.* 2007;334(1):72-9.
- Cooper DM, Radon-Ayzik S, Schwindt C, et al. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory responses to physical activity. *J Appl Physiol.* 2007;103:700–9.
- Costongs GMPJ, Janson PCW, Bas BM, et al. Short-term and long-term intra-individual variations and critical differences of hematological laboratory parameters. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1985;23:69-76.

Coutts AJ, Reaburn P, Piva TJ, et al. Monitoring for overreaching in rugby league players. *Eur J Appl Physiol.* 2007;99:313-24.

Crouch DJ. Oral fluid collection: the neglected variable in oral fluid testing. *Forensic Sci Int.* 2005;150:165-73.

de Oliveira VN, Bessa A, Lamounier RP, et al. Changes in the salivary biomarkers induced by an effort test. *Int J Sports Med.* 2010;31:377-81.

DeCaro, J.A. Methodological considerations in the use of salivary α -amylase as a stress marker in field research. *Am J Hum Biol.* 2008;20:617-9.

Demacker PNM, Schade RWB, Jansen RTP, et al., Intra-individual variation of serum cholesterol, triglycerides and high density lipoprotein cholesterol in normal humans. *Atherosclerosis.* 1982;45:259-66.

Denny P, Hagen FK, Hardt M, et al. The proteome of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *J Proteome Res* 2008;7(5):1994-2006.

Diab-Ladki R, Pellat B, Chahine, R. Decrease in the antioxidant activity in patients with periodontal diseases. *Clin Oral Invest.* 2003;7:103-7.

Dot D, Miró J, Fuentes-Arderiu X. Within-subject biological variation of hematological quantities and analytical goals. *Arch Pathol Lab Med.* 1992;116:825-6.

Eckfeldt JH, Chambless LE, Shen Y. Short-term, within-person variability in clinical chemistry test results. *Arch Pathol Lab Med.* 1994;118:496-500.

Fatouros IG, Chatznikolaou A, Douroudos II, et al., Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *J Strength Cond Res.* 2010;24(12):3278-86.

- Fielding R, Manfredi T, Ding W, et al. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265:R166-72.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative Stress. Relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58.
- Fox PC. Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. *J Am Dent Assoc.* 1985;110(4):519-25.
- Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Libeer JC, et al. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem.* 1997;34:8-12.
- Fraser CG, Petersen PH. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem.* 1999;45(3):321-3.
- Fraser CG, Wilkinson SP, Neville RG, et al. Biologic variation of common hematologic laboratory quantities in the elderly. *Am J Clin Pathol.* 1989;92:465-70.
- Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington DC. AACC Press; 2001.
- Fraser CG. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1989; 27(5):409-37.
- Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):758-64.
- Gallagher P, Leitch MM, Massey AE, et al. Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method. *J. Psychopharmacol.* 2006;20(5): 643-9.
- Garcia MC, de Souza A, Bella GP, et al. Salivary cortisol levels in Brazilian citizens of distinct socioeconomic and cultural levels. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1148:504-8.

- Gilman SC, Thornton R, Miller D, et al. Effects of exercise stress on parotid gland secretion. *Horm Metab Res*. 1979;11(7):454.
- Gleeson M, Pyne DB. Exercise effects on mucosal immunity. *Immunol Cell Biol*. 2000;78: 536-44.
- Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol*. 2007;103: 693-9.
- Gonzalez D, Marquina R, Rondón N. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. *Res Sports Med*. 2008;16:128-37.
- Granger DA, Kivlighan KT, el-Sheikh M, et al. Salivary α -amylase in biobehavioral research. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1098:122-44.
- Granger DA, Shirtcliff EA, Booth A, et al. The “trouble” with salivary testosterone. *Psychoneuroendocrinology*. 2004; 29:1229-40.
- Gröschl M, Köhler H, Topf HG, et al. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. *J Pharmaceut Biomed Anal*. 2008;47: 478-86.
- Gröschl M. Current status of salivary hormone analysis. *Clin Chem*. 2008;54(11):1759-69.
- Guder WG, Narayanan S, Wiser H, Zatwa B. *Samples: from the patient to the laboratory*. Wiley-VCH, Germany. 2003.
- Halson SL, Jeukendrup AE. Does overtraining exist? An analysis of overreaching and overtraining research. *Sports Med*. 2004;34(14):967-81.

- Hansen AM, Garde AH, Christensen JM, et al. Evaluation of a radioimmunoassay and establishment of a reference interval for salivary cortisol in healthy subjects in Denmark. *Scand J Clin Lab Invest*. 2003;63:303-10.
- Hansen AM, Garde AH, Persson R. Sources of biological and methodological variation in salivary cortisol and their impact on measurement among healthy adults: A review. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(6):448-58.
- Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a “reference change” or comparing two consecutive measurements. *Clin Chem*. 1983;29:25-30.
- Harris EK. Effects of intra and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. *Clin Chem*. 1974;20(12):1535-42.
- Hartmann U, Mester J. Training and overtraining markers in selected sport events. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2000;32(1): 209-15.
- Hawley JA, Tipton KD, Millard-Stafford ML. Promoting training adaptations through nutritional interventions. *J Sports Sci*. 2006;24(7):709-21.
- Hodinka RL, Nagashunmugam T, Malamud D. Detection of human immunodeficiency virus Antibodies in oral fluids. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 1998;5(4):419-26.
- Hold KM, de Boer D, Zuidema J, et al. Evaluation of the Salivette as sampling device for monitoring beta-adrenoceptor blocking drugs in saliva. *J Chromatogr*. 1995;663:103–10.
- Horn PS, Feng L, Li Y, et al. Effect of outliers and nonhealthy individuals on reference interval estimation. *Clin Chem*. 2001;47:2137-45.
- Horn PS, Pesce AJ, Coperland BE. Reference intervals: un update. *Clin Chim Acta*. 2003;334:5-23.

- Hu S, Xie Y, Ramachandran P, et al. Large scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*. 2005;5(6):1714-28.
- Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol*. 2004;49(12):951-62.
- Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85(2):162-9.
- Iglesias N, Petersen PH, Ricós C. Power functions of the reference change value in relation to cut-off points, reference intervals and index of individuality. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(4):441-8.
- Ispirlidis I, Fatouros IG, Jamurtas AZ, et al. Time-course of changes in inflammatory and performance responses following a soccer game. *Clin J Sport Med*. 2008;18:423–31.
- Jones AR, Twedt D, Swaim W, et al. Diurnal change of blood count analytes in normal subjects. *Am J Clin Pathol*. 1996;106:723-7.
- Jou YJ, Lin CD, Lai CH, et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer. *Anal Chim Acta*. 2010;681(1-2):41-8.
- Joyner MJ, Green DJ. Exercise protects the cardiovascular system: effects beyond traditional risk factors. *J Physiol*. 2009;587(23):5551-8.
- Kalk WWI, Vissink A, Stegenga B, et al. Sialometry and sialochemistry: a non-invasive approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(2):137-44.
- Kaufman E, Lamster IB. The Diagnostic application of saliva. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(2):197-202.

- Kenttä G, Hassmén P, Raglin JS. Training practices and overtraining syndrome in Swedish age-group athletes. *Int J Sports Med*. 2001;22(6):460-5.
- Kraemer WJ, Ratamess NA. Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. *Sports Med*. 2005;35(4):339-61.
- Kuipers H, Dubravcic-Simunjak S, Moran J, et al. Blood testing in sport: Hematological profiling. *Int J Sports Med*. 2010;31:542-7.
- Lac G, Maso F. Biological markers for the follow-up of athletes throughout the training season. *Pathol Biol*. 2004;52: 43-49.
- Lamm ME. Current concepts in mucosal immunity IV. How epithelial transport of IgA antibodies related to host defense. *Am J Physiol*. 1998;274:614-17.
- Langman LJ. The use of oral fluid for therapeutic drug management. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1098:145-66.
- Lazarim FL, Antunes-Neto JMF, Oliveira da Silva FC, et al. The upper values of creatine kinase of professional soccer players during a Brazilian national championship. *J Sci Med Sport*. 2009;12(1):85-90.
- Lee IM. Physical activity and cancer prevention — data from epidemiologic studies. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35:1823-7.
- Levine M.J. Salivary macromolecules. A structure/function synopsis. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;20(694):11-6.
- Li TL, Gleeson M. The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and-amylase responses. *J Sports Sci*. 2004;22:1015–24.

- Lippi G, Brocco G, Franchini M, et al. Comparison of serum creatinine, uric acid, albumin and glucose in male professional endurance athletes compared with healthy controls. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(6):644–47.
- Lippi G, De Vita F, Salvagno GL, et al. Measurement of morning saliva cortisol in athletes. *Clin Biochem*. 2009;42:904-6.
- Lippi G, Montagnana M, Franchini M, et al. The paradoxical relationship between serum uric acid and cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2008;392:1-7.
- Lloyd JE, Broughtton A, Selby C. Salivary creatinine assays as a potential screen for renal disease. *Ann Clin Biochem*. 1996;33:428-31.
- Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem*. 1997;43(1):52-8.
- Malcovati L, Pascutto C, Cazzola M. Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica* 2003;88:570-81.
- Matsuo R, Garrett JR, Proctor GB, et al. Reflex secretion of proteins into submandibular saliva in conscious rats, before and after preganglionic sympathectomy. *J Physiol*. 2000;15(527):175-84.
- McDowell SL, Chaloa K, Housh TJ, et al. The effect of exercise intensity and duration on salivary immunoglobulin A. *Eur J Appl Physiol*. 1991; (63):108-11.
- Meeusen R, Duclos M, Gleeson M, et al. Prevention, diagnosis and treatment of the Overtraining Syndrome. *Eur J. Sport Science*. 2006;6(1):1-14.
- Mercer KW, Densmore JJ. Hematologic disorders in the athletes. *Clin Sports Med*. 2005;24:599–621.

- Michishige F, Kanno K, Yoshinaga S, et al. Effect of saliva collection method on the concentration of protein components in saliva. *J Med Invest*. 2006;53:140-6.
- Moore S, Calder KA, Miller NJ, et al. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res*. 1994;21(6):417-25.
- Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, et al. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(3):268-77.
- Nater UM, La Marca R, Florin L, et al. Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity-associations with adrenergic activity. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(1):49-58.
- Nater UM, Rohleder N, Gaab J, et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int J Psychophysiol*. 2005;55(3):333–42.
- Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, et al. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology*. 2007;32:392–401.
- Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009;34:486-96.
- Nieman DC, Henson DA, Fagoaga OR, et al. Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *Int J Sports Med*. 2002; 23:69–75.
- Nieuw Amerongen AV, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries Res*. 2004; 38:257-53.
- Nieuw Amerongen AV, Ligtenberg AJ, Veerman EC. Implications for diagnostics in the biochemistry and physiology of saliva. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1098:1-6.

Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(1):191-8.

Nunes LAS, Gandra PG, Alves AA, et al. Adequacies of skin puncture for evaluating biochemical and hematological parameters in athletes. *Clin J Sport Med.* 2006;16(5):418-21.

O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, et al. The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations. *J Anal Toxicol.* 2000;24:536-42.

Ohkuwa T, Itoh H, Yamazaki Y, et al. Salivary and blood lactate after supramaximal exercise in sprinters and long distance runners. *Scand J Med Sci Sports.* 1995;5(5):285-90.

Omar F, van der Watt GF, Pillay TS. Reference change values: how useful are they? *J Clin Pathol.* 2008;61:426-7.

Owen-Smith B, Quiney J, Read, J. Salivary urate in gout, exercise and diurnal variation. *Lancet.* 1998;351(9120):1932.

Patel RS, Shaw SR, Macintyre H, et al. Production of gender-specific morning salivary cortisol reference intervals using internationally accepted procedures. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(12):1424-9.

Pattwell DM, McArdle A, Morgan JE, et al. Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(7):1064-72.

- Peake JM, Suzuki K, Coombes JS. The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and relationship to oxidative stress after exercise. *J Nutr Biochem.* 2007;18(6):357-71.
- Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem.* 1992;38:1933–53.
- Petersen PH, Fraser CG, Sandberg S, et al. The index of individuality Is Often a Misinterpreted Quantity Characteristic. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37(6):655-61.
- Petibois C, Cazorla G, Poortmans JR, et al. Biochemical Aspects of Overtraining in Endurance Sports. *Sports Med.* 2002;32(13):867-78.
- Powers SK, Duarte J, Kavazis AN, et al. Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Exp Physiol.* 2009;95(1):1-9.
- Raggam RB, Santner BI, Kollroser M, et al. Evaluation of a novel standardized system for collection and quantification of oral fluid. *Clin Chem Lab Med.* 2008a;46(92):287-91.
- Raggam RB, Wagner J, Michelin BDA, et al. Reliable Detection and Quantitation of Viral Nucleic Acids in Oral Fluid: Liquid Phase-Based Sample Collection in Conjunction with Automated and Standardized Molecular Assays. *J Med Virol.* 2008b;80:1684–8.
- Rao PV, Reddy AP, Lu X, et al. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes. *J. Proteome Res.* 2009;8(1):239-45.
- Rehak NN, Cecco SA, Csako G. Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(4):335-43.

- Ricós C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biologic variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999;59:491–500. Available via DIALOG.<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Accessed 20 Set 2009.
- Ricós C, Cava F, Garcia-Lario JV, et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64:175-84.
- Ricós C, Iglesias N, Garcia-Lario JV, et al. Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem*. 2007;44:343-52.
- Rifai N, Warnick GR. Quality specifications and the assessment of the biochemical risk of atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2004;346:55-64.
- Ritchie RF, Palomaki G. Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):702-9.
- Robinson N, Sottas PE, Mangin P, et al. Bayesian detection of abnormal hematological values to introduce a no-start rule for heterogeneous populations of athletes. *Haematologica*. 2007;92(8):1142-4.
- Robinson Y, Cristancho E, Boning D. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2006;38(3):480-3.
- Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary α -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34:469-85.
- Ross SM, Fraser CG. Biological variation of cardiac markers: analytical and clinical considerations. *Ann Clin Biochem*. 1998;35:80-4.

- Santos RV, Almeida AL, Caperuto EC, et al. Effects of a 30-km race upon salivary lactate correlation with blood lactate. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2006;145(1):114-7.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*. 2000;21:55-89.
- Sari-Sarraf V, Reilly T, Doran DA, et al. The effects of single and repeated bouts of soccer-specific exercise on salivary IgA. *Arch Oral Biol*. 2007;52:526-32.
- Sawka MN, Convertino VA, Eichner R, et al. Blood volume: importance and adaptations to exercise training, environmental stresses, and trauma/sickness. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(2):332-48.
- Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, et al. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med. Sci. Sports Exerc*. 2002;34(5):869-75.
- Schwartz EB, Granger DA. Transferrin enzyme immunoassay for quantitative monitoring of blood contamination in saliva. *Clin Chem*. 2004;50(3):546-55.
- Scully C. HIV topic update: salivary testing for antibodies. *Oral Dis*. 1997;3:212-15.
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, et al. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26:165-73.
- Smith SJ, Cooper GR, Myers GL, et al. Biological variability in concentrations of serum lipids: sources of variation among results from published studies and composite predicted values. *Clin Chem*. 1993;39(6):1012-22.

- Solberg HE. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. 5. Statistical treatment of collected reference values - determination of reference limits. *Clin Chim Acta*. 1987;170:S13-32.
- Solberg HE. The IFCC recommendations on estimation of reference intervals. The RefVal Program. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):710-4.
- Sottas PE, Robinson N, Saugy M. The athlete's biological passport and indirect markers of blood doping. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;195:305-26.
- Statland BE, Winkel P, Harris SC, et al. Evaluation of biologic sources of variation of leukocyte counts and other hematologic quantities using very precise automated analyzers. *Am J Clin Pathol*. 1978;69(1):48-54.
- Strano-Rossi S, Leone D, de la Torre X, et al. Analysis of stimulants in oral fluid and urine by gas chromatography-mass spectrometry II: pseudophedrine. *J Anal Toxicol*. 2010;34(4):210-5.
- Talwar DK, Azharuddin MK, Williamson C, et al. Biological variation of vitamins in blood of healthy individuals. *Clin Chem*. 2005;51:2145-50.
- Toigo M, Boutellier U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. *Eur J Appl Physiol*. 2006;**97**:643-63.
- Trilck M, Flitsch J, Lüdecke DK, et al. Salivary cortisol measurement – a reliable method for diagnosis of cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005;113(4):225-30.
- Trujillo-Ortiz A, Hernandez-Walls R. Cochtest: Cochran's test for homogeneity of variances for equal or unequal sample sizes. 2003. Available via DIALOG.

<http://www.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/loadFile.do?objectId=3292&objectType=FILE>. Accessed 20 Set 2009.

Turpeinen U, Välimäki MJ, Hämäläinen E. Determination of salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69(5):592-7.

Urhausen A, Kindermann W. Diagnosis of Overtraining. What Tools Do We Have? *Sports Med*. 2002;32(2):95-102.

Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem*. 1983;29(10):1752-56.

Wagner J, Cik M, Marth E, et al. Feasibility of testing three salivary stress biomarkers in relation to naturalistic traffic noise exposure. *Int J Hyg Environ Health*. 2009; 213(2):153-5.

Walsh NP, Bishop NC, Blackwell J, et al. Salivary IgA response to prolonged exercise in a cold environment in trained cyclists. *Med Sci Sports Exerc*. 2002;34:1632-37.

Walsh NP, Blannin AK, Clark AM, et al. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and α -amylase. *J Sport Sci*. 1999;17:129-34.

Weight LM, Byrne MJ, Jacobs P. Haemolytic effects of exercise. *Clin Sci (Lond)*. 1991;81(2):147-52.

Westgard JO. Design of internal quality control for reference value studies. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(7):863-7.

Westgard JO. Internal quality control: planning and implementation strategies. *Ann Clin Biochem*. 2003;40:593–611.

Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(3):313-21.

Wu AHB, Lu QA, Todd J, et al. Short- and long-term biological variation in cardiac troponin I measured with a high-sensitivity assay: implications for clinical practice. *Clin Chem.* 2009a;55:52-8.

Wu AHB, Smith A, Wians F. Interpretation of creatine kinase and aldolase for statin-induced myopathy: Reliance on serial testing based on biological variation. *Clin Chim Acta.* 2009b;399:109-11.

Youssef H, Groussard C, Machefer G, et al. Comparison of total antioxidant capacity of salivary, capillary and venous samplings: interest of the salivary total antioxidant capacity on triathletes during training season. *J Sports Med Phys Fitness.* 2008; 48:522-9.

Zakowski JJ, Bruns DE. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1985;21:283-322.

Zar JH. *Biostatistical Analysis* NJ: Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 1999.

ANEXO 1

VARIAÇÃO BIOLÓGICA PARA ANALITOS QUANTIFICADOS NO SANGUE DE INDIVÍDUOS FISICAMENTE ATIVOS

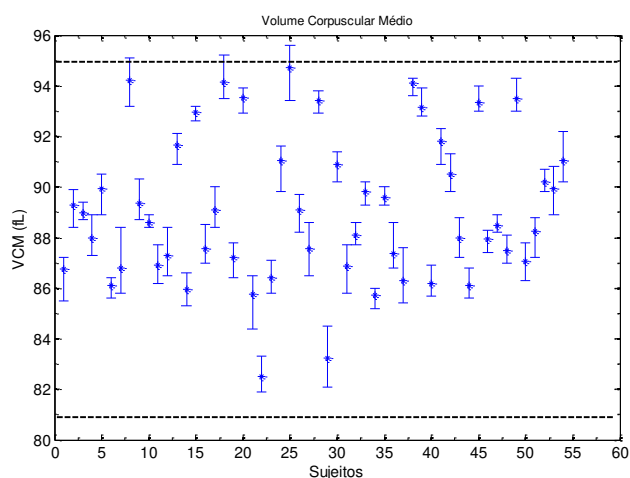


Figura 1 – Variação biológica para MCV. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

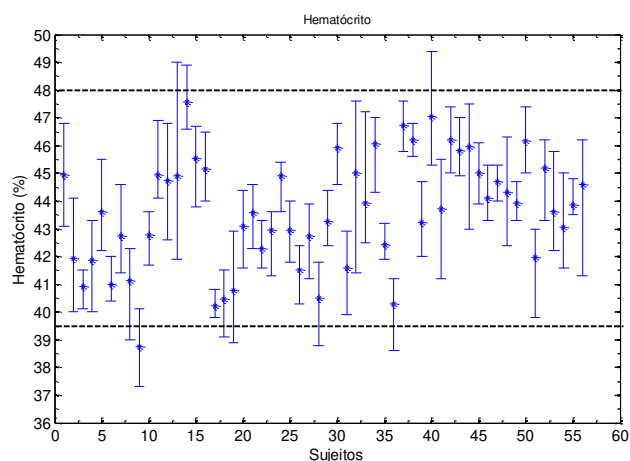


Figura 2 – Variação biológica para Hematócrito. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

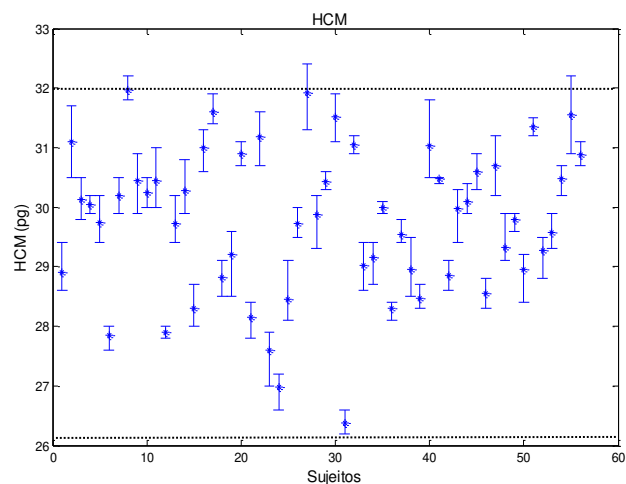


Figura 3 – Variação biológica para HCM. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

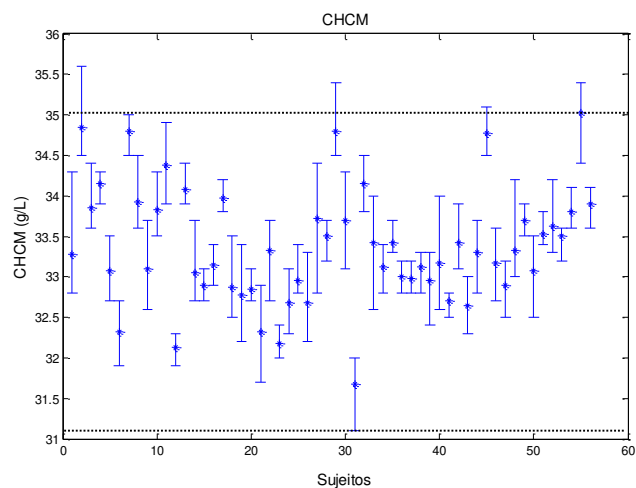


Figura 4 – Variação biológica para CHCM. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

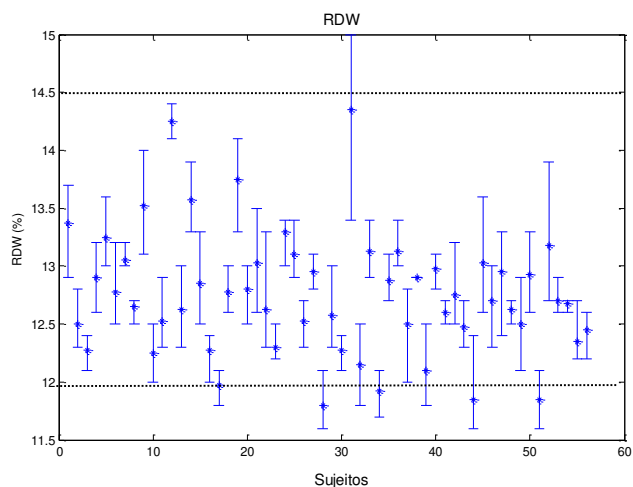


Figura 5 – Variação biológica para RDW. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

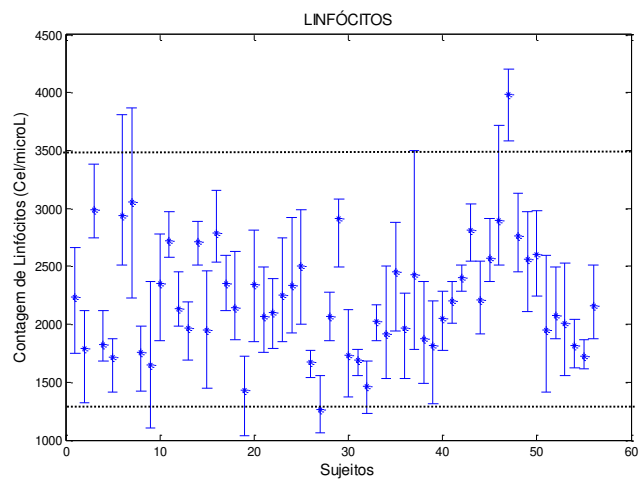


Figura 6 – Variação biológica para contagem de linfócitos. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

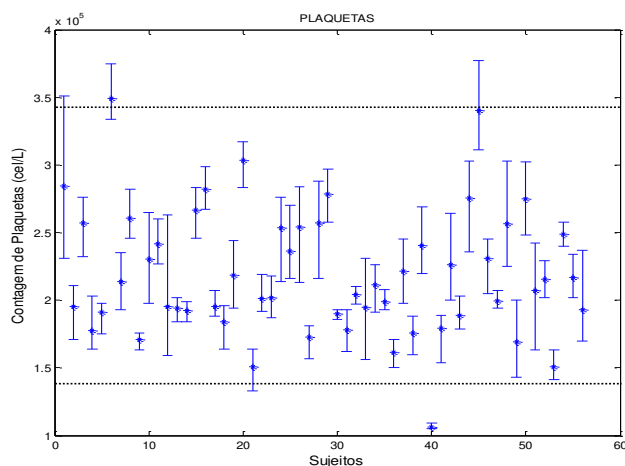


Figura 7 – Variação biológica para contagem de plaquetas. Valores apresentados mostram media, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos quatro momentos. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

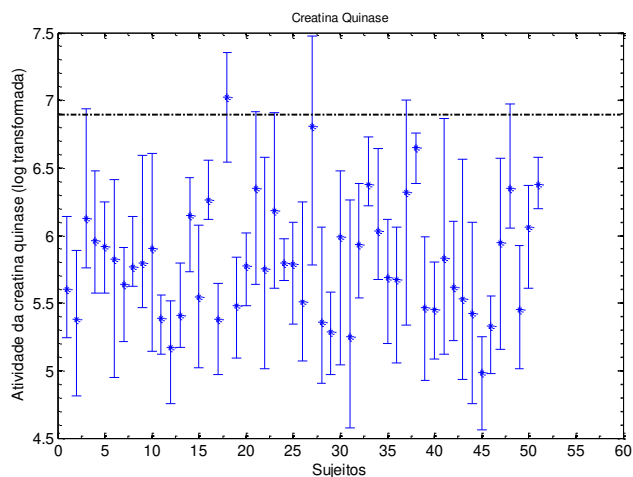


Figura 8 – Variação biológica para a enzima CK em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linha pontilhada horizontal representa o intervalo de referência superior (percentil 97,5) para a mesma população fisicamente ativa.

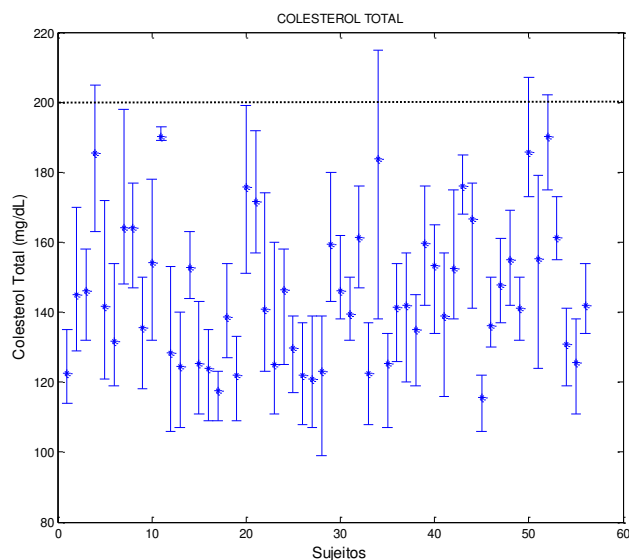


Figura 9 – Variação biológica para as concentrações de colesterol total em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linha pontilhada horizontal representa o intervalo de referência superior (percentil 97,5) para a mesma população fisicamente ativa.

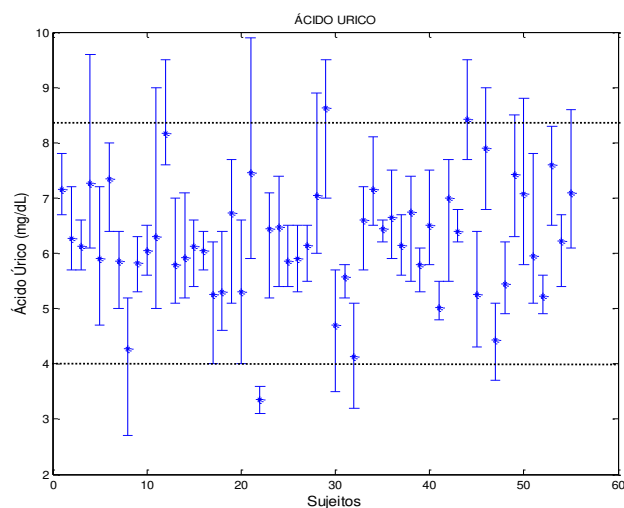


Figura 10– Variação biológica para as concentrações de ácido úrico em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

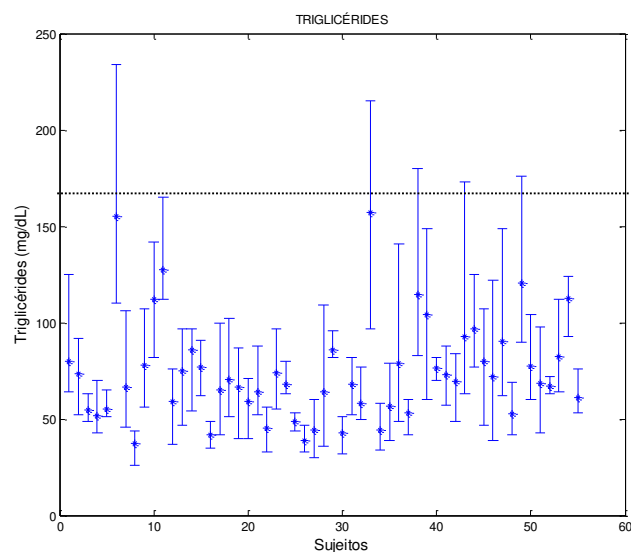


Figura 11 – Variação biológica para as concentrações de colesterol total em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linha pontilhada horizontal representa o intervalo de referência superior (percentil 97,5) para a mesma população fisicamente ativa.

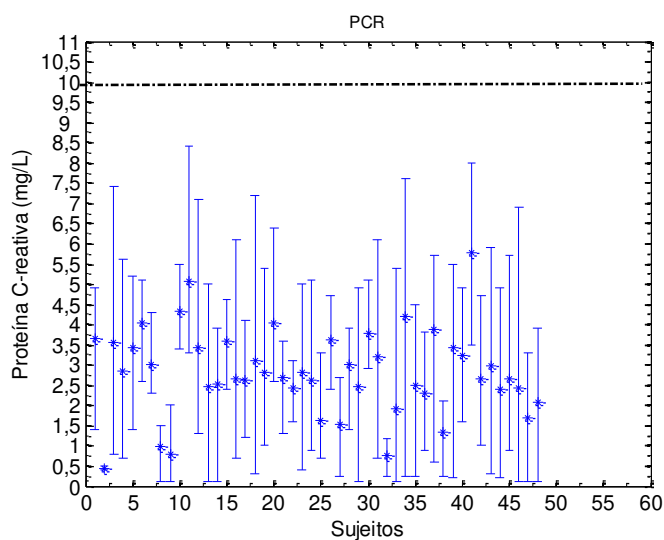


Figura 12 – Variação biológica para as concentrações PCR em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linha pontilhada horizontal representa o intervalo de referência superior (percentil 97,5) para a mesma população fisicamente ativa.

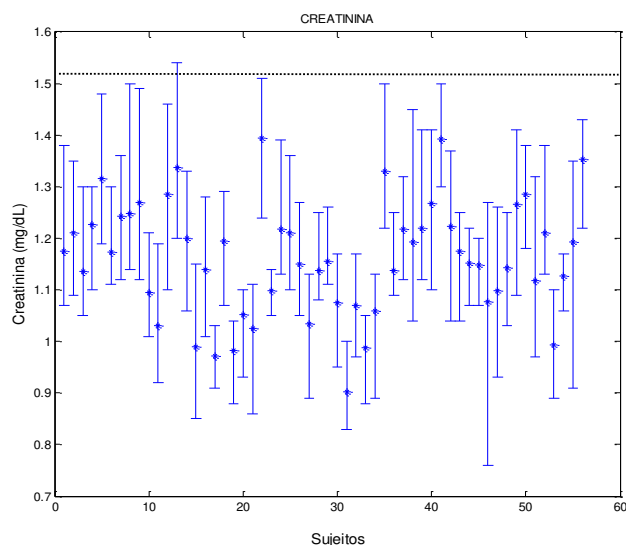


Figura 13 – Variação biológica para as concentrações creatinina sérica em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linha pontilhada horizontal representa o intervalo de referência superior (percentil 97,5) para a mesma população fisicamente ativa.

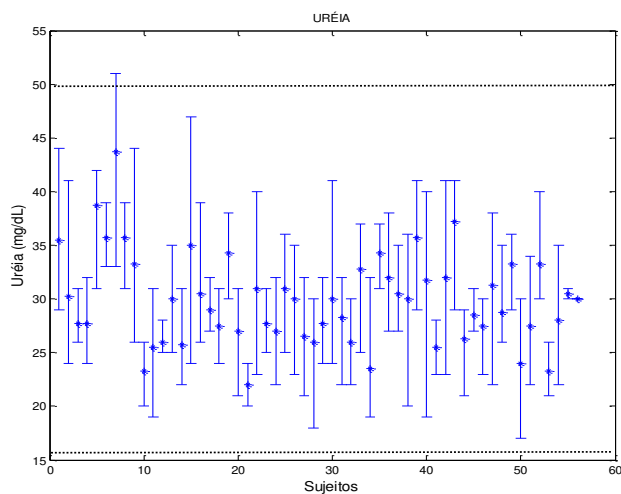


Figura 14– Variação biológica para as concentrações de uréia em indivíduos fisicamente ativos. Valores apresentados mostram média, valor mínimo e máximo para cada indivíduo nos 4 momentos de coleta. Linhas pontilhadas horizontais representam o intervalo de referência (percentil inferior 2,5 e 97,5 percentil superior), obtidos de sujeitos (n=300) da mesma população fisicamente ativa.

ANEXO 2

**PARECER DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES
HUMANOS (CEP) FCM/UNICAMP**

Andamento do projeto - CAAE - 0200.0.146.000-08				
Título do Projeto de Pesquisa				
ESTUDO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA SALIVA E SANGUE DE JOGADORES DE FUTEBOL E PESSOAS FISICAMENTE ATIVAS				
Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	17/04/2008 16:11:54	19/05/2008 16:17:38		
Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	10/04/2008 11:20:30	Folha de Rosto	FR186685	Pesquisador
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	17/04/2008 16:11:56	Folha de Rosto	0200.0.146.000-08	CEP
3 - Protocolo Aprovado no CEP	19/05/2008 16:17:37	Folha de Rosto	260/2008	CEP

[Voltar](#)

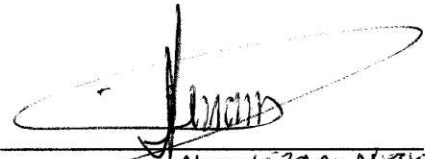
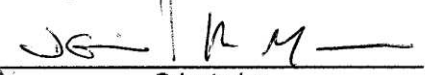
DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de Doutorado intitulada: Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos na Saliva e Sangue de Indivíduos Fisicamente Ativos:

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

(x) tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões) de Bioética ou Biossegurança*:
Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/FCM-Unicamp, sob Protocolo(s)
nº CAAE: 0200.0.146.000-08.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*


Aluno: Luiz Henrique Messonhau S. Muniz

Orientador:

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

☒ Deferido () Indeferido

Nome: Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
Função: Presidente do
Comitê de Ética em Pesquisa
FCM/UNICAMP
Matrícula: 28856-6

ANEXO 3

PUBLICAÇÕES, COMUNICAÇÕES EM CONGRESSOS E EXPERIÊNCIA DOCENTE DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO.

Artigos completos publicados em periódicos

1. Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference change values of blood analytes from physically active subjects. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(1):191-8.
2. Lazarim FL, Antunes-Neto JMF, Oliveira da Silva FC, Nunes LAS, Bassini-Cameron A, Cameron LC, Alves AA, Brenzikofer R, Macedo DV. The upper values of creatine kinase of professional soccer players during a Brazilian national championship. *J Sci Med Sport.* 2009;12(1):85-90.
3. Machado EFA, Normand ACR, Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Effects of different general anesthetics on serum hemolysis and hepatic and muscular glycogenolysis in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2009;42:1035-8.
4. Bessa A, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LAS, Bassini-Cameron A, Werneck-de-Castro JPS, Macedo DV, Cameron LC. High Intensity ultraendurance promotes early release of muscle injury markers. *Br J Sports Med.* 2008;42:889-93.

Trabalhos completos publicados em congressos

1. Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference change value applied to soccer player monitoring. First European Joint Congress of EFCC and UEMC. Lisboa, Portugal. 2010.
2. Oliveira RB, Nunes LAS, Ferraresco R, Brenzikofer, René, Brenzikofer R, Macedo DV, Hohl, R. Oxidative Stress of an Endurance Overtraining Animal Model. ACSM 57th Annual Meeting - World Congress on Exercise is Medicine, Baltimore. 2010.

3. Kovacs L, Zamboni CB, Nunes LAS, Macedo DV. Sodium analysis in whole blood of athletes using NAA. AIP Conference Proceedings. 2010;1265:423-6.
4. Nunes LAS, Lourenço TF, Tessuti LS, Macedo DV. Cinética do estado ácido básico em diferentes intensidades do exercício. 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Porto Alegre, Brasil. 2009.
5. Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Diferença crítica como ferramenta para o monitoramento longitudinal de atletas. 36º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Porto Alegre, Brasil. 2009.
6. Nunes LAS, Gandra PG, Macedo DV. Valores de Referência para Capacidade Antioxidante no Soro e Saliva de Indivíduos Praticantes de Atividade Física Regular. Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial. São Paulo. Brasil. 2008.
7. Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference intervals for biochemical parameters in physically active subjects. 20th International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Fortaleza. Brasil. 2008.
8. Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference change value of some current blood parameters in sports science in physically active subjects. I International meeting in exercise physiology. São Carlos. Brasil. 2008.
9. Nunes LAS, Nissenbaum M, Monteiro A, Gandra PG, Nunes LAS, Cameron LC, Macedo DV. Monitoramento de parâmetros bioquímicos e hematológicos durante uma prova de revezamento de ciclismo de 800 km. 34º Congresso Brasileiro de Análises Clínicas. Belo Horizonte. Brasil. 2007.

10. Oliveira da Silva FC, Ferraresco, Ferrucci DL, Nunes LAS, Macedo DV. Effect of eleven weeks training program on inflammatory, hematological and biochemical parameters in rat skeletal muscle, liver and serum. I International meeting in exercise physiology. São Carlos. Brasil. 2008.

Palestras ministradas em congressos e simpósios.

1. Passaporte biológico: o papel do laboratório na avaliação e monitoramento do atleta. V Encontro da Qualidade Laboratorial. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Campinas, SP, Brasil. 2010.
2. Estabelecimento de Valores de Referência para Analitos em Amostras de Saliva com Aplicação no Monitoramento de Atletas. Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial. Salvador, Brasil. 2007
3. Saliva Collection System – Greiner Bio-One: padronização da técnica e valores de referência para analitos em saliva. II Workshop em Ciência do Exercício e Saúde. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, Brasil. 2007

Experiência Docente

Agosto 2010 – atual: Professor do curso de Ciências Biomédicas das Faculdades Integradas Metropolitanas de Campinas – METROCAMP.

Disciplinas: Bioquímica Clínica, Imunologia Clínica e Estágio supervisionado em Análises Clínicas.