

Efek Suplementasi Selenium terhadap Marker Darah Pasca Cedera Kontusio

Mariel Daba¹, Vita Murniati Tarawan², Aziiz Mardanarian Rosdianto², Ronny Lesmana², Hanna Goenawan²

Abstrak

Selenium adalah *trace element* yang bersifat antioksidan merupakan komponen pembentuk selenoprotein. Pada keadaan tertentu, seperti terjadinya cedera diperlukan suplementasi selenium untuk mengatur respon inflamasi. Cedera kontusio meningkatkan respon inflamasi pada otot ataupun jaringan yang dimulai dengan terjadinya vasodilatasi, peningkatan aliran darah, peningkatan permeabilitas vascular, dan mengarah pada pembentukan edema di lokasi cedera. **Tujuan:** Mempelajari efek suplementasi selenium terhadap perubahan marker darah pada tikus yang diberi cedera kontusio. **Metode:** Desain eksperimental dengan menggunakan hewan coba tikus jantan (*Rattus norvegicus*), berusia 8 minggu, memiliki berat badan 200-220 gr, di kelompokkan ke dalam 3 kelompok yaitu: kelompok Kontrol, kelompok Kontusio, kelompok Kontusio + Selenium. Suplementasi selenium diberikan per oral pada hari 1-3 setelah cedera dengan dosis 0,0153 mg/KgBB ke dalam PGA 2%. Pengukuran marker seperti *White Blood Cell* (WBC), limfosit, monosit, dan neutropil dilakukan pada hari ke 3 setelah perlakuan. **Hasil:** Penelitian ini menemukan bahwa perlakuan suplementasi selenium pasca cedera otot yang berdasarkan pada pengukuran marker darah seperti WBC, limfosit, dan monosit, lebih tinggi pada kelompok kontusio dan lebih rendah pada kelompok selenium. Neutrofil lebih tinggi pada kelompok kontusio dan selenium. Hal ini tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol. Hasil pengukuran marker darah yang dilakukan cenderung ada perubahan tetapi tidak bermakna secara statistik. **Simpulan:** Perlakuan suplementasi selenium pada tikus pasca cedera kontusio tidak memberikan perubahan yang signifikan pada marker darah seperti WBC, limfosit, monosit, dan neutrophil.

Kata kunci: antioksidan, kontusio, marker darah, selenium

Abstract

Selenium is a trace element that has antioxidant properties and is a component of selenoproteins. In certain circumstances, such as injury, selenium supplementation is required to regulate the inflammatory response. Contusion injury increases the inflammatory response to a muscle or tissue that begins with vasodilation, increases blood flow, increases vascular permeability, and leads to edema formation at the site of injury. **Objectives:** To determine the effect of selenium supplementation on changes in blood markers in rats treated with contusion injury. **Methods:** Experimental design, using experimental male rats (*Rattus norvegicus*), eight weeks old, weighing 200-220 grams, divided into three groups, namely: The Control group, the Contusion group, the Contusion + Selenium group. Selenium supplementation was given orally on days 1-3 after injury at the dose of 0.0153 mg/kgBW into 2% PGA. Examination of markers such as White Blood cells (WBC), lymphocytes, monocytes, and neutrophils was carried out on day three after treatment. **Results:** This study found that the administration of post-muscular selenium supplementation based on examination of blood markers such as WBC, lymphocytes, monocytes was higher in the contusion group and lower in the selenium group. Neutrophils were higher in the contusion and selenium groups. These were not significantly different from the control group. The result of blood marker examination tended to change, but it was not statistically significant. **Conclusion:** Selenium supplementation in post-contusive injury mice did not provide significant changes in blood markers such as WBC, lymphocytes, monocytes, and neutrophils.

Keywords: antioxidant, blood marker, contusion, selenium

Affiliasi penulis: ¹Magister Program Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia. ²Divisi Fisiologi, Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia

Korespondensi : Hanna Goenawan, Departemen Ilmu Kedokteran Dasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran, Jatinangor km 21.6, Bandung. Email: hanna@unpad.ad.id. Telp: 022-7794585

PENDAHULUAN

Cedera otot rangka yang paling umum di klasifikasikan ke dalam cedera strain, laserasi dan kontusio, yang lebih sering terjadi pada atlet profesional seperti silat, taekwondo, karate dan sepak bola. Cedera yang dialami sebagian besar di sebabkan oleh trauma mekanis yang paling sering terjadi pada tungkai bawah.¹ Cedera Kontusio secara klinis dimanifestasikan oleh nyeri lokal, pembengkakan, berkurangnya rentang gerak sendi, dan nyeri tekan saat di palpasi.² Cedera kontusio biasanya terjadi akibat kontak langsung secara tiba-tiba dan gaya tekan pada otot. Kerusakan jaringan yang disebabkan oleh cedera kontusio dapat memicu respon inflamasi dimulai dengan terjadinya vasodilatasi, peningkatan aliran darah, peningkatan permeabilitas vascular dan mengarah pada pembentukan edema di lokasi cedera.³ Pada tingkat molekuler cedera kontusio menyebabkan nekrosis yang bersifat sementara, infiltrasi sel inflamasi, dan peningkatan ekspresi sitokin pro inflamasi.² Proses pro-inflamasi yang terjadi mendominasi selama 48 jam pertama setelah cedera otot rangka akut. Cedera otot akibat trauma benda tumpul dapat menyebabkan terjadinya fase inflamasi yang muncul 2 – 6 jam setelah cedera. Pada fase ini ditandai dengan migrasi leukosit ke lokasi cedera dimulai dengan infiltrasi neutrofil dan makrofag. Neutrofil dari mikrovaskuler yang rusak adalah yang pertama menyerang lokasi cedera, sehingga menyebabkan kerusakan membran sel.⁴

Pada area yang terkena cedera (kerusakan jaringan) menyebabkan terjadinya akumulasi dari leukosit (misalnya granulosit).⁵ Peristiwa ini disertai dengan perubahan mikrovaskuler dan peningkatan regulasi molekul adhesi dengan mengedarkan leukosit dan sel endotel, sehingga mengakibatkan eksudasi cairan, protein dan masuknya granulosit (umumnya neutrophil dan eosonofil tergantung pada stimulus) dari darah ke jaringan yang terkena cedera.^{3,5} Neutrofil dan monosit adalah leukosit pertama yang tiba dan mempengaruhi respon inflamasi selama terjadinya cedera otot.⁶

Penelitian sebelumnya menemukan bahwa lari jarak jauh mampu meningkatkan jumlah leukosit total yang bersirkulasi dengan peningkatan neutrophil,

monosit, dan limfosit, termasuk sel B dan sel T. Peningkatan jumlah leukosit, limfosit, monosit, dan neutrophil juga ditemukan pada saat bersepeda, treadmill, dan lomba lari.^{7,8,9,10,11} Leukosit sering dikaitkan dengan infeksi atau peradangan.¹² Kerusakan otot mempengaruhi profil leukosit,¹³ Fungsi leukosit sangat dipengaruhi oleh keseimbangan dari antioksidan, karena sel imun dapat menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) untuk mendukung fungsinya.^{13,14}

Tingkat antioksidan sangat penting untuk mempertahankan homeostasis redoks dan memiliki fungsi terutama selama terjadi stres oksidatif seperti cedera otot.¹⁴ Dalam kondisi fisiologis normal, sistem antioksidan selular menghilangkan molekul yang terjadi kerusakan.¹⁵ Pemberian suplementasi berupa protein, antioksidan dan *trace element* memiliki peran penting dalam proses pemulihan cedera otot.¹⁶ Selenium merupakan mikronutrien yang memiliki peran dalam mengurangi stress oksidatif melalui selenoprotein yang berfungsi sebagai antioksidan.^{17,18} Selenium sebagai antioksidan dapat mereduksi edema, infiltrasi sel mast, dan ekspresi TNF-alpha, serta inaktivasi NF-kB.¹⁹

Berdasarkan hal diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mempelajari efek yang diberikan oleh suplementasi selenium pada marker darah pasca cedera kontusio.

METODE

Penelitian ini adalah studi eksperimental pada hewan coba yang sudah disetujui secara etik oleh Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran, Universitas Padjajaran Bandung Nomor: 1013/UN6. KEP/EC/2020. Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus jantan galur wistar, berusia 8 minggu, dengan berat 200-220 gr, yang diberikan perlakuan berupa cedera kontusio dan perlakuan suplementasi selenium pada hari 1-3 pasca cedera kontusio. Tikus yang digunakan berjumlah 15 ekor, yang dibagi kedalam 3 kelompok, yaitu: kelompok kontrol, kelompok kontusio (hanya diberikan cedera kontusio), dan kelompok selenium (kontusio + suplementasi selenium dengan dosis 0,0153 mg/kgBB yang dilarutkan dalam PGA 2%) dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 ekor. Sediaan selenium yang

digunakan pada penelitian ini adalah L-selenomethionine 200 mcg (*Nature'sWay co. Ltd, USA*).

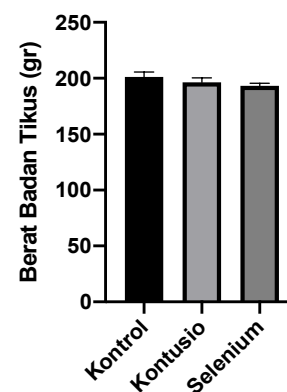
Prosedur pembuatan kontusio dilakukan berdasarkan penelitian Macedo *et al* (2016).²⁰ Tikus di timbang dan dianestesi terlebih dahulu dengan ketamin dan xylazine (dosis 80 dan 10 mg/kgBB) secara intraperitoneal. Tungkai belakang tikus dicukur dan dibersihkan dengan alcohol 70%. Bagian tengah otot ditentukan dengan palpasi kemudian area perlakuan diberi tanda dengan tinta permanen. Tungkai belakang tikus diposisikan pada papan, pergelangan kaki diposisikan dorsi flexi hingga 90 derajat. Cedera dilakukan pada otot *gastrocnemius* kanan menggunakan perangkat yang terdiri dari platform kayu dengan tabung aluminium berongga, lurus, pada 5 cm, ditempatkan tegak lurus ke *platform*, dengan tabung aluminium seberat 75% dari berat badan tikus, dan dijatuhkan dari ketinggian 30 cm ke permukaan otot *gastrocnemius* kanan.²⁰ Setelah perlakuan cedera kontusio kelompok perlakuan selenium mendapatkan suplementasi selenium yang diberikan per oral selama tiga hari. Perlakuan dosis selenium pada tikus sebesar 0,0153 mg/kgBB, yang dilarutkan ke dalam PGA 2%. Sedangkan untuk kelompok kontrol dan kontusio diberikan placebo berupa PGA 2%.

Pengambilan darah dilakukan dari pembuluh darah retro orbital sebanyak 0,5 ml. Darah disimpan dalam tabung EDTA dan pemeriksaan marker darah berupa *White Blood Cell* (WBC), limfosit, neutrophil dan monosit dilakukan dengan alat VetScan HMSv2.2 (Abaxis, Inc. Union City, CA). Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ketiga pasca perlakuan suplementasi selenium pada seluruh kelompok perlakuan.

Analisis statistik menggunakan GraphPad Prism versi 8.3.1. Data hasil ditampilkan dalam bentuk *mean* \pm *standard error of mean* (SEM). Normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-Wilk test*, data yang berdistribusi normal dianalisis menggunakan *one-way ANOVA* dan dilanjutkan dengan *post-hoc test Least Significant Difference* (LSD).

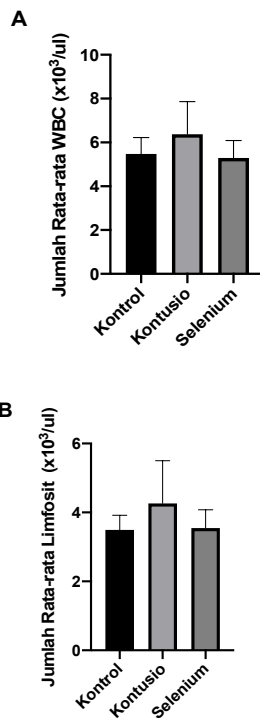
HASIL

Pemeriksaan darah lengkap *Sysmex* dilakukan untuk melihat perubahan yang terjadi pada marker darah seperti WBC, Limfosit, Monosit Dan Neutrofil pada hari ketiga setelah perlakuan. Data hasil berat badan tikus dalam penelitian ini ditampilkan pada Gambar 1. Hasil penelitian ini menemukan bahwa rata-rata berat badan tikus berkisar antara 200-220 gr. Dan tidak terdapat perbedaan antar kelompok. Data marker darah ditunjukkan pada Gambar 2A, 2B dan Gambar 3A, 3B; ($p > 0,05$).



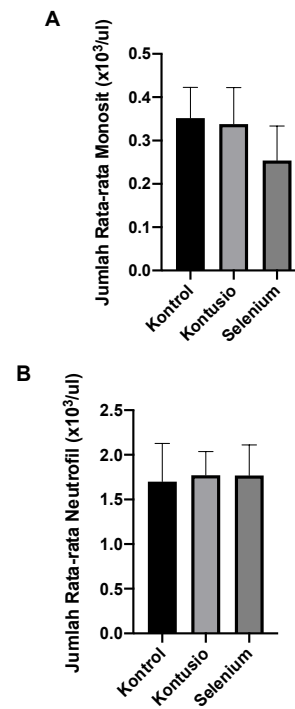
Gambar 1. Grafik berat badan tikus. Data berat badan tikus pada ketiga kelompok penelitian. Berat badan tikus yang digunakan pada penelitian ini berkisar antara 200-220 gr. Data ditampilkan dalam bentuk *mean* \pm SEM.

Tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada berat badan tikus yang digunakan dalam penelitian ini pada masing-masing kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa berat badan tikus pada penelitian ini sudah homogen dan perubahan jumlah marker darah pada tikus pasca cedera tidak dipengaruhi oleh berat badan tikus.



Gambar 2. Perubahan rerata WBC dan limfosit pasca perlakuan. Rerata WBC ditampilkan pada gambar 2A dan rerata limfosit ditampilkan pada gambar 2B. Data ditampilkan dalam bentuk *mean* \pm *SEM*.

Rerata WBC cenderung lebih tinggi pada kelompok kontusio (rerata = 6,374) dibandingkan kelompok selenium (rerata = 5,288), walaupun tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol (rerata= 5,472) (**Gambar 2A**). Jumlah rerata limfosit lebih tinggi juga terjadi pada kelompok kontusio (rerata = 4,264) dibandingkan kelompok kontrol (rerata = 3,494) dan selenium (rerata= 3,546) (**Gambar 2B**). Berdasarkan uji *one-way* ANOVA tidak terdapat pengaruh atau tidak signifikan $p > 0,05$ pada setiap kelompok.



Gambar 3. Perubahan rerata monosit dan neutrofil pasca perlakuan. Rerata monosit ditampilkan pada gambar 3A dan rerata neutrofil ditampilkan pada gambar 3B. Data ditampilkan dalam bentuk *mean* \pm *SEM*.

Rerata monosit lebih tinggi pada kelompok kontrol (rerata = 0,352) dan kontusio (rerata = 0,338) dan lebih rendah pada kelompok selenium (*mean* = 0,254) (**Gambar 3A**), sedangkan marker darah yang di lihat dari perubahan jumlah rerata Neutrofil lebih tinggi pada kelompok kontusio (rerata = 1,772) dan selenium (rerata = 1,77), dan lebih rendah pada kelompok kontrol (rerata= 1,702) (**Gambar 3B**). Berdasarkan uji *one-way* ANOVA tidak terdapat pengaruh atau tidak signifikan $p > 0,05$ pada setiap kelompok.

Pengukuran WBC, limfosit, monosit dan leukosit dilakukan untuk melihat perubahan yang terjadi pasca pemberian cedera kontusio dan perlakuan suplementasi selenium. Penelitian ini menemukan bahwa berdasarkan rerata jumlah WBC dan limfosit cenderung lebih tinggi pada kelompok kontusio (kelompok yang hanya diberikan cedera kontusio tanpa diberikan suplementasi selenium), sedangkan jumlah rerata WBC dan limfosit lebih rendah pada kelompok selenium (kelompok yang diberikan cedera kontusio + suplementasi selenium), dan juga kelompok kontrol (**Gambar 2A**; $p > 0,74$ dan **2B**; $p > 0,76$) walaupun tidak bermakna secara statistik. Perubahan marker darah juga dilihat pada jumlah rerata dari monosit dan neutrofil. Jumlah rerata monosit lebih tinggi pada kelompok kontrol dan kelompok kontusio, sedangkan jumlah rerata lebih rendah pada kelompok selenium (**Gambar 3A**; $P > 0,64$). Marker darah dari jumlah rerata neutrofil lebih tinggi pada kelompok selenium dan kontusio dan lebih rendah pada kelompok kontrol, namun hal ini tidak berbeda secara signifikan pada uji statistik (**Gambar 3B**; $P > 0,98$).

Hasil pengukuran marker darah WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil pasca perlakuan cedera kontusio dan suplementasi selenium pada tikus, cenderung meningkat namun tidak bermakna secara statistik.

PEMBAHASAN

Penelitian ini menemukan bahwa tidak terdapat perubahan yang signifikan dari marker darah (WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil). Hal ini dapat disebabkan oleh teknik pengambilan darah dan waktu pengambilan darah yang dilakukan pada hari terakhir pasca perlakuan. Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa pengambilan darah melalui *retro-orbital* secara konsisten menghasilkan jumlah WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil terendah pada tikus, dan paling rendah di jantung.^{21,22} Pengambilan darah melalui ekor menghasilkan jumlah WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil yang lebih tinggi secara signifikan.^{21,22} Pengambilan darah lengkap yang dilakukan dengan dua metode yaitu melalui ekor dan vena safena menghasilkan jumlah WBC, limfosit, dan neutrofil yang

tinggi.²³ Metode pengambilan darah pada penelitian ini yang dilakukan melalui *sinus retro-orbital* menghasilkan jumlah yang berbeda. Maka untuk penelitian selanjutnya pengambilan darah bisa dilakukan melalui ekor.

Waktu pengambilan sampel darah juga mempengaruhi perubahan jumlah WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil. Analisis jumlah WBC terkait dengan waktu pengambilan darah menunjukkan perubahan setelah empat jam pengambilan darah.²⁴ Jumlah neutrophil menunjukkan peningkatan volume dan penurunan dari waktu ke waktu. Jumlah limfosit relatif stabil, sedangkan monosit terjadi peningkatan substansial dan penurunan setelah 24 jam.²⁴ Hasil ini sejalan dengan penelitian terdahulu ditemukan bahwa, ketidakstabilan parameter neutrophil terkait dengan peningkatan volume sel neutrophil setelah 4-6 jam, berlawanan dengan parameter monosit yang stabil hingga 12 jam.²⁵ Berdasarkan penelitian terdahulu direkomendasikan untuk pengambilan sampel darah harus dilakukan segera mungkin,²⁶ dalam waktu 4-10 jam.²⁴

Pada penelitian yang dilakukan oleh Gomes *et al* (2020) jumlah WBC didapatkan lebih tinggi pasca perlakuan dan kembali menurun dalam waktu 30 menit, jumlah limfosit dan neutrofil lebih tinggi pasca perlakuan dan kembali ke nilai awal setelah 24 jam, sedangkan jumlah monosit dengan cepat kembali ke nilai awal sebelum 30 menit.²⁷ Penelitian lain menemukan bahwa jumlah WBC dan neutrofil meningkat pasca perlakuan dan mengalami peningkatan lebih lanjut 2 jam setelah perlakuan, dan kembali menurun dalam 24 jam setelah perlakuan. Jumlah limfosit meningkat segera setelah perlakuan, dan dalam 2 jam terjadi pengurangan jumlah limfosit, dan jumlah monosit meningkat segera setelah perlakuan.²⁸ Pada penelitian ini waktu pengambilan darah dilakukan 72 jam pasca perlakuan. Maka untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan pengambilan darah 4-10 jam pasca perlakuan.

Peneliti menemukan bahwa perubahan jumlah rata-rata marker darah seperti WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil, tergantung pada lokasi, cara pengambilan sampel, respon stres yang disebabkan oleh teknik pengambilan darah dan juga waktu pengambilan sampel darah perlu diperhatikan.

SIMPULAN

Suplementasi selenium yang diberikan pasca cedera kontusio pada tikus jantan galur wistar tidak mengakibatkan perubahan rerata jumlah WBC, limfosit, monosit, dan neutrofil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Asisten Penelitian Tim Divisi Fisiologi, Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Universitas Padjadjaran yang telah membantu selama penelitian berlangsung. Penelitian ini oleh Hibah Internal Universitas Padjadjaran Riset Percepatan Lektor Kepala (LPLK) No. 1959/UN6.3.1/PT.00/2021 Kepada HG.

DAFTAR PUSTAKA

- Dantas MGB, Damasceno CMD, De Barros VRP, Menezes ES, Fontoura HDS, de Lima RS, *et al.* Creation of a contusion injury method for skeletal muscle in rats with differing impacts. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2017;32(5): 369–75.
- Kary JM. Diagnosis and management of quadriceps strains and contusions. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. 2010; 3(4): 26–31.
- Chazaud B. Inflammation and skeletal muscle regeneration: Leave It to the Macrophages! *Trends in Immunology*. 2020; 41(6):481–92.
- Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 2010; 298(5): 173-87.
- Sugimoto MA, Vago JP, Perretti M, Teixeira MM. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. *Trends in Immunology*. 2019; 40(3):212–27.
- Pittman K, Kubers P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *Journal of Innate Immunity*. 2013; 5(4):315–23.
- Luk HY, McKenzie AL, Duplanty AA, Budnar RG, Levitt D, Fernandez A, *et al.* Leukocyte subset changes in response to a 164-km road cycle ride in a hot environment. *International Journal of Exercise Science*. 2016; 9(1):34–46.
- Strömberg A, Rullman E, Jansson E, Gustafsson T. Exercise-induced upregulation of endothelial adhesion molecules in human skeletal muscle and number of circulating cells with remodeling properties. *Journal of Applied Physiology*. 2017;122(5):1145–54.
- Siedlik JA, Deckert JA, Benedict SH, Bhatta A, Dunbar AJ, Vardiman JP. T cell activation and proliferation following acute exercise in human subjects is altered by storage conditions and mitogen selection. *Journal of Immunological Methods*. 2017; 446(10):7–14.
- Peake JM, Suzuki K, Wilson G, Hordern M, Nosak K, MacKinnon L, Coombes JS. Exercise-induced muscle damage, plasma cytokines, and markers of neutrophil activation. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2005; 37(5):737–45.
- Žáková A, Knechtle B, Chlábková D, Miličková M, Rosemann T, Nikolaidis PT. The effect of a 100-km ultra-marathon under freezing conditions on selected immunological and hematological parameters. *Frontiers in Physiology*. 2017; 8 (9): 1–9.
- Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the regulation of immune functions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2015;135 (suppl 1):355-80.
- Peake JM, Neubauer O, Gatta PAD, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2017; 122(3): 559–70.
- Hajian S. Positive effect of antioxidants on immune system. *Immunopathol Persa*. 2015;1(1):1-2
- Gravina L, Ruiz F, Diaz E, Lekue JA, Badiola A, Irazusta J. M. Influence of nutrient intake on antioxidant capacity, muscle damage and white blood cell count in female soccer players. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2012; 9(32):1–11.
- Quintero K J, Resende A de S, Leite GSF, Lancha Junior AH. An overview of nutritional strategies for recovery process in sports-related muscle injuries. *Nutrire*. 2018; 43(1):1–10.
- Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezis, GP. Selenium-dependent antioxidant enzymes: Actions

- and properties of selenoproteins. *Antioxidants*. 2018; 7(5):1–26.
18. Gholami M, Zendedel A, Khanipour khayat Z, Ghanad K, Nazari A, Pirhadi A. Selenium effect on ischemia-reperfusion injury of gastrocnemius muscle in adult rats. *Biological Trace Element Research*. 2015;164(2):205–11.
19. Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: Molecular pathways and physiological roles. *Physiological Reviews*. 2014; 94(3):739–77.
20. Macedo ACB de, Ywazaki JL, Macedo RM de, Noronha L, Gomes ARS. Morphologic study of different treatments for gastrocnemius muscle contusion in rats. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*. 2016; 51(6): 697–706.
21. Hoggatt J, Hoggatt AF, Tate TA, Fortman J, Pelus LM. Bleeding the laboratory mouse: Not all methods are equal. *Experimental Hematology*. 2016; 44(2):132-7.e1.
22. Nemzek JA, Bolgos GL, Williams BA, Remick DG. Differences in normal values for murine white blood cell counts and other hematological parameters based on sampling site. *Inflammation Research*. 2001; 50(10): 523–7.
23. Abatan OI, Welch KB, Nemzek JA. Evaluation of saphenous venipuncture and modified tail-clip blood collection in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2008; 47(3):8–15.
24. Naoum FA, Martin FH de O, Valejo MR, Oliveira MG de L. Assessment of time-dependent white blood cells degeneration induced by blood storage on automated parameters and morphology examination. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2020; 42(4):185–8.
25. Pérez I, Redín ME. Stability of leukocyte research parameters over time on the Sysmex XN: How to quantify the changes in cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2018; 40(5):569–76.
26. Zini G. Stability of complete blood count parameters with storage: Toward defined specifications for different diagnostic applications. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2014; 36(2):111–3.
27. Gomes JH, Mendes RR, Franca CS, da Silva-Grigoletto ME, da Silva DRP, Antonioli AR, *et al.* Acute leucocyte, muscle damage, and stress marker responses to high-intensity functional training. *PLoS One*. 2020; 15(12):1–17.
28. Fortunato AK, Pontes WM, De Souza DMS, Prazeres JSF, Marcucci-Barbosa LS, Santos JMM. Strength training session induces important changes on physiological, immunological, and inflammatory biomarkers. *Journal of Immunology Research*. 2018; 8(2):1–12.