

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**

**TESE**

**Biomarcadores de Estresse Oxidativo e do  
Metabolismo Muscular na Saliva de Equinos**

**Bruno Ferreira Spíndola**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DO  
METABOLISMO MUSCULAR NA SALIVA DE EQUINOS**

**BRUNO FERREIRA SPÍNDOLA**

*Sob a orientação de*  
**Paulo de Tarso Landgraf Botteon**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, pelo Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária,  
área de concentração Ciências Clínicas

Seropédica, RJ  
Junho de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

8757b Spindola, Bruno Ferreira, 1986-  
Biomarcadores de estresse oxidativo e do  
metabolismo muscular na saliva de equinos / Bruno  
Ferreira Spindola. - 2017.  
66 f. : il.

Orientador: Paulo de Tarso Landgraf Botteon.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, 2017.

1. Antioxidante. 2. Enzimas musculares. 3.  
Malondialdeído. 4. Saliva. I. Botteon, Paulo de Tarso  
Landgraf, 1964-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

BRUNO FERREIRA SPÍNDOLA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.


TESE APROVADA EM 26/06/2017

  
Paulo de Tarso Landgraf Botteon (Ph. D) UFRRJ  
(orientador)

  
Daniel Augusto Barroso Lessa (Ph. D) UFF

  
Paulo César Amaral Ribeiro da Silva (Ph. D) UFF

  
Tiago Marques dos Santos (Ph. D) UFRRJ

  
Carlos Henrique Machado (Ph. D) UFRRJ

Às minhas éguas, Estrela Spin e Flicka Spin, e aos meus cães, Kira e Falcon, pela inspiração e perseverança em trilhar o caminho da Medicina Veterinária.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por muitas vezes frente às dificuldades foi nos seus ensinamentos que me fei para não desistir.

Ao meu pai Héilton e minha mãe Elza por acreditarem em mim e sempre me incentivarem.

Aos meus irmãos Héilton e Daniel por sempre me apoiarem.

Ao meu avô Walter e minha avó Maria por toda ajuda e por estarem sempre ao meu lado.

A minha esposa Simone grande companheira que a UFRRJ colocou no meu caminho, por me apoiar sempre, mesmo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. Paulo Botteon por acreditar em mim e pela orientação que me proporcionou conhecimento e amadurecimento.

A Prof. Dra. Rita Botteon por me ajudar na parte escrita do trabalho.

Ao Prof. Fábio Scott e ao pessoal do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) por permitirem a realização dos hemogramas e análises bioquímicas.

A aluna de iniciação científica Fabrícia Matioli por ser meu braço direito na parte experimental, sendo de fundamental importância para realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de equipe (Fabrícia, Luís, Lucas, Érica e Bruno) por me ajudarem a executar este trabalho, sem eles este trabalho seria muito mais difícil.

A Tatiane Godoi por ter disponibilizado os animais e a estrutura do setor de equideocultura da UFRRJ.

E a todos que foram importantes, mas que infelizmente a memória me pregou uma peça e acabei esquecendo de citar.

Muito obrigado!

## RESUMO

SPÍNDOLA, Bruno Ferreira. **Biomarcadores de estresse oxidativo e do metabolismo muscular na saliva de equinos**. 2017. 66p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A análise da saliva tem potencial para ser empregada como meio capaz de fornecer biomarcadores de estresse oxidativo, metabólico e eletrolítico para animais em atividade atlética, podendo ser coletada de forma não invasiva, reduzindo o desconforto dos animais. O presente trabalho teve como objetivos avaliar o potencial da saliva como meio para amostragem e determinação de biomarcadores de estresse oxidativo (malondialdeído e capacidade antioxidante total) e do metabolismo (para creatino quinase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, lactato, proteína total e ácido úrico). Foram utilizados equinos da raça Mangalarga Marchador com idade entre três e 15 anos provenientes do criatório da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A saliva foi coletada após a limpeza da cavidade bucal, sendo inserido um rolo de algodão hidrófilo com auxílio de uma pinça hemostática longa no interior da boca dos equinos e as amostras de sangue foram obtidas por punção venosa da jugular, logo após a limpeza da boca. As médias dos resultados obtidos na análise da saliva foram: proteína total 0,9 g/dL, ácido úrico 1,2 mg/dL, aspartato aminotransferase 528 UI/L, creatino quinase 72,1 UI/L, lactato desidrogenase 2268,2 UI/L, lactato 3,9 mmol/L e a mediana do malondialdeído foi 1,6 nmol/mL. Conclui-se que valores enzimáticos salivares colhidos apresentam correlação baixa ou nula com os valores séricos, quando colhidos simultaneamente, assim o emprego da saliva como biomarcador depende do desenvolvimento de pesquisas específicas e a saliva pode ser empregada em substituição ao plasma ou soro sanguíneos para análise de TBARS.

**Palavras chave:** antioxidante, enzimas musculares, malondialdeído e saliva

## ABSTRACT

SPÍNDOLA, B.F. **Biomarkers of oxidative stress and muscle metabolism in equine saliva.** 2017. 66p. Thesis (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Saliva has the potential to be used as a sample capable of providing biomarkers of oxidative, metabolic and electrolytic stress for animals in athletic activity, and it can be drawn non-invasively, reducing the discomfort of the animals. The objective of this study was to evaluate the potential of saliva as a biological sample for sampling and determining biomarkers of oxidative stress (malondialdehyde and total antioxidant capacity) and metabolism (for creatine kinase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, lactate, total protein and uric acid). Mangalarga Marchador horses aged between 3 and 15 years old were used from the Federal Rural University of Rio de Janeiro's farm. Saliva was drawn after cleaning up the oral cavity, after that a hydrophilic cotton roller held by a long hemostatic tweezers was inserted in the mouth of the horses, and blood samples were obtained by venipuncture of the jugular vein immediately after cleaning the mouth. The mean of salivary results were: total protein 0.9 g/dL, uric acid 1.2 mg/dL, aspartate aminotransferase 528 IUI/L, creatine kinase 72.1 IUI/L, lactate dehydrogenase 2268.2 IUI/L, lactate 3.9 mmol/L and the median of malondialdehyde was 1.6 nmol/ml. It is concluded that salivary enzyme values collected have low or zero correlation with serum values when harvested simultaneously, so the use of saliva as a biomarker depends on the development of specific researches and saliva can be used instead of plasma or serum for analysis of TBARS.

**Key words:** antioxidant, muscle enzymes, malondialdehyde e saliva.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da concentração de proteína (g/dL) no soro e saliva de equinos. ....	21
<b>Tabela 2.</b> Média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação de ácido úrico (mg/dL) entre saliva e soro. ....	23
<b>Tabela 3.</b> Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade da enzima AST (UI/L). ....	25
<b>Tabela 4.</b> Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade da emzima CK (UI/L). ....	29
<b>Tabela 5.</b> Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade da enzima LHD (UI/L).....	29
<b>Tabela 6.</b> Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade do lactato (mmol/L).....	31
<b>Tabela 7.</b> Concentração de malondialdeído em amostras de plasma, soro e saliva de equinos. ....	33
<b>Tabela 8.</b> Valores de correlação e regressão de malondialdeído (MDA) entre amostras de plasma, soro e saliva.....	34

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Equino contido com cabresto para lavagem da cavidade bucal com água corrente para remoção de substâncias sólidas da boca e saliva..... 15
- Figura 2.** Algodão hidrófilo fixado de forma asséptica em uma das extremidades por fio cirúrgico em forma de cruz (A). Pinça hemostática longa para auxiliar na coleta de saliva através do algodão hidrófilo (B)..... 15
- Figura 3.** Pinça com algodão posicionado na região sublingual do cavalo. .... 16
- Figura 4.** Algodão hidrófilo em tubo de plástico de fundo cônico, capacidade de 10 mL, mantido posicionado por fios de linha fixados externamente na tampa rosqueada. .... 16
- Figura 5.** Saliva de equino em frasco cônico de 10 mL após centrifugação ..... 17
- Figura 6.** Analisador automatizado de acesso randômico para realização de dosagens bioquímicas e turbidimétricas, por leitura fotométrica (A15, Biosystems, Barcelona, Espanha)..... 19
- Figura 7.** Box-Plot dos valores de proteína total na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos, evidenciando em vermelho à direita um valor atípico (outlier)..... 22
- Figura 8.** Box-Plot dos valores de proteína total na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após a eliminação de *outliers* (n=55)..... 22
- Figura 9.** Box-Plot dos valores de proteína total no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos. Observa-se à direita e esquerda valores atípicos (*outliers*)..... 22
- Figura 10.** Box-Plot dos valores de proteína total no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após exclusão dos *outliers* n=55. .... 23
- Figura 11.** Box-Plot dos valores de ácido úrico na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos. Observa-se à direita e à esquerda a presença de valores atípicos (*outlier*)..... 24
- Figura 12.** Box-plot dos dados de ácido úrico na saliva de equinos, após eliminação de *outliers* n=55. .... 24
- Figura 13.** Box-Plot distribuição dos valores de ácido úrico no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos. Observa-se à direita valor atípico (*outlier*)..... 24
- Figura 14.** Box-Plot distribuição dos valores de ácido úrico no soro de equinos após a exclusão de *outliers* n=55..... 25

<b>Figura 15.</b> Box-Plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos evidenciando à direita valores atípicos ( <i>outleirs</i> ).....	26
<b>Figura 16.</b> Box-plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) na saliva de equinos, após eliminação de <i>outleirs</i> (n=54). .....	26
<b>Figura 17.</b> Box-Plot dos valores de aspartato aminotrasnferase (AST) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à esquerda valores atípicos ( <i>outleirs</i> ).....	26
<b>Figura 18.</b> Box-Plot dos valores de AST no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após a exclusão de <i>outleirs</i> (n=54).....	27
<b>Figura 19.</b> Box-plot dos dados da enzima creatino quinase (CK) na saliva de equinos, com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à direita valores atípicos ( <i>outleirs</i> ).....	27
<b>Figura 20.</b> Box-Plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à direita valor atípico ( <i>outleirs</i> ).....	28
<b>Figura 21.</b> Box-plot dos dados da creatino quinase (CK) na saliva de equinos, após eliminação de <i>outliers</i> (n=56). .....	28
<b>Figura 22.</b> Box-plot dos dados da da creatino quinase (CK) no soro de equinos, após eliminação de valores atípicos (n=56).....	28
<b>Figura 23.</b> BoxPlot dos valores da enzima lactato desidrogenase (LDH) na saliva de equinos antes da retirada dos valores atípicos. ....	29
<b>Figura 24.</b> Box-Plot dos valores de lactato desidrogenase (LDH) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se a presença de dados atípicos ( <i>outliers</i> ).....	30
<b>Figura 25.</b> Box-Plot dos valores de lactato desidrogenase (LDH) na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após exclusão de <i>outlier</i> (n=56). .....	30
<b>Figura 26.</b> Box-Plot dos valores de lactato desidrogenase (LDH) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após da exclusão de <i>outliers</i> (n=56)....	30
<b>Figura 27.</b> Box-Plot dos valores de lactato na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à direita dados discrepantes ( <i>outliers</i> ).....	31
<b>Figura 28.</b> Box-Plot dos valores de lactato no plasma de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se dados discrepantes ( <i>outliers</i> ).....	32

<b>Figura 29.</b> Box-plot dos valores de lactato na saliva de equinos, após eliminação de <i>outliers</i> (n=50).....	32
<b>Figura 30.</b> Box-plot dos valores de lactato no plasma de equinos, após eliminação de valores atípicos (n=50). .....	32
<b>Figura 31.</b> Dispersão dos níveis de malondialdeído (MDA) em $\mu\text{mol/mL}$ no plasma de equinos (n=55). .....	33
<b>Figura 32.</b> Dispersão dos níveis de malondialdeído (MDA) em $\mu\text{mol/mL}$ no soro de equinos, n=55.....	34
<b>Figura 33.</b> Dispersão dos níveis de malondialdeído (MDA) $\mu\text{mol/mL}$ na saliva de equinos, n=55.....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AST	Asparato aminotransferase
ATP	Trisfosfato de adenosina
CEUA	Comitê de ética de usos de animais em pesquisa
CK	Creatinoquinase
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
LDH	Lactato desidrogenase
LQEPV	Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária
MDA	Malondialdeído
OH	Radical hidroxila
TAS	Capacidade antioxidante total
UA	Ácido úrico
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VL4	Velocidade em que se chega a concentração de 4 mMol/L de lactato
CK-mb	creatinoquinase isoforma mb)
UI/L	Unidades internacionais por litro
mmol/L	milimol por litro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1 Saliva .....	2
2.1.1 Glândulas salivares .....	2
2.1.2 Controle .....	2
2.1.3 Composição .....	3
2.1.4 Aplicação clínica em humanos .....	4
2.1.5 Aplicações em equinos .....	6
2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) .....	7
2.3 Fisiologia e Bioquímica no Exercício .....	9
2.3.1 Creatinoquinase (CK).....	9
2.3.2 Aspartato aminotransferase (AST) .....	10
2.3.3 Lactato desidrogenase (LDH).....	11
2.3.4 Lactato .....	11
2.3.5 Ácido úrico .....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Comitê de Ética .....	14
3.2 Local .....	14
3.3 Valores de Referência para Biomarcadores Salivares .....	14
3.3.1 Animais.....	14
3.3.2 Amostragem .....	14
3.4 Coleta das Amostras de Saliva .....	14
3.5 Amostras de Sangue .....	17
3.6 Análises Laboratoriais .....	18
3.6.1 Hematologia .....	18
3.6.2 Análise bioquímica e metabolismo oxidativo .....	18
3.7 Análises Estatísticas .....	19
3.7.1 Cálculo dos intervalos de referência.....	19
3.7.2 Cálculo de MDA.....	20
4 RESULTADOS .....	21
4.1 Proteína Total .....	21
4.2 Ácido Úrico .....	23
4.3 Aspartato Aminotransferase (AST).....	25
4.4 Creatina Quinase (CK) .....	27
4.5 Lactato Desidrogenase (LDH).....	29
4.6 Lactato .....	31
4.7 Malondialdeído (MDA) - Capacidade Antioxidante (Estresse Oxidativo) .....	33
5 DISCUSSÃO .....	35
5.1 Proteína Total .....	35
5.2 Malondialdeído (MDA) – Espécies Reativas ao Ácido Tiobrabitúrico (TBARS).....	36
5.3 Ácido Úrico .....	36
5.4 Aspartato Aminotransferase e Creatina Quinase.....	37
5.5 Lactato Desidrogenase.....	39
5.6 Lactato .....	40
6 CONCLUSÃO.....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1 INTRODUÇÃO

A equideocultura baseia-se principalmente nas habilidades atléticas do cavalo em desempenhar as mais diferentes funções, desde o lazer até modalidades esportivas de alto desempenho. Apesar do acréscimo de conhecimento relacionado à fisiologia do exercício, dos processos metabólicos e patológicos decorrentes da atividade física desenvolvida pelos cavalos durante o trabalho ou competição, muitos dos estudos produzidos até o momento foram executados em outros países, onde as condições de criação, alimentação e clima são diferentes das condições brasileiras. Paralelamente a esta necessidade de produção de dados adequados à realidade brasileira, a busca de novos métodos de monitoramento da atividade atlética ou de processos patológicos se faz necessária, visando principalmente à identificação de biomarcadores para diagnóstico tanto do estado atlético destes animais como de problemas associados ao exercício.

Atualmente, o plasma sanguíneo é o principal meio utilizado para medir respostas induzidas pelo exercício, contudo, a saliva poder ser empregada como um meio para avaliar alterações metabólicas em diferentes condições visto que as glândulas salivares possuem mecanismos de trocas transportando proteínas e íons diretamente para a saliva.

A análise da saliva tem potencial para ser empregada como meio capaz de fornecer biomarcadores de estresse oxidativo, de processos metabólicos e do equilíbrio eletrolítico para animais em atividade atlética e enfermos. As técnicas de coleta de saliva são minimamente invasivas e podem reduzir o desconforto dos animais, simplificar as coletas de amostras repetidas e reduzir o risco de infecções ou transmissão de doenças. Para o seu emprego, é necessário identificar os biomarcadores salivares de estresse oxidativo e do *status* metabólico capazes de representar as alterações decorrentes do exercício agudo no cavalo e condição orgânica do mesmo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial da saliva como meio para amostragem e determinação de biomarcadores de estresse oxidativo (malondealdeído e capacidade antioxidante total) e do metabolismo (para creatino quinase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase, lactato, proteínas totais e ácido úrico) em equinos da raça Mangalarga Marchador e determinar a correlação desses marcadores na saliva e no soro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Saliva

#### 2.1.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares de equinos compreendem três pares de glândulas bem definidas e glândulas menores (lóbulos dispersos de tecido salivar). As principais glândulas salivares são a parótida, a mandibular e a sublingual. As glândulas salivares menores incluem a labial, a bucal, lingual e a palatina (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009).

A glândula salivar parótida localiza-se ventralmente à orelha em relação à borda caudal da mandíbula. O ducto salivar dessa glândula passa ventralmente e cranialmente na face profunda da parte caudal da mandíbula, e atravessa a face superficialmente ao músculo masseter. O ducto passa então dorsalmente para penetrar a membrana mucosa da bochecha perto do terceiro ou quarto dente pré-molar. A glândula salivar mandibular localiza-se ventralmente à glândula parótida, caudal para a mandíbula. O ducto salivar mandibular passa para frente ao longo do lado medial da mandíbula desembocando ventralmente à língua na carúncula sublingual, uma pequena membrana mucosa localizada no assoalho da boca. A glândula sublingual está localizada profundamente à membrana ao longo do lado ventral da superfície lateral da língua perto do assoalho da boca. Numerosos ductos partem diretamente da glândula para abrir no assoalho da boca ventrolateral para a língua. Com exceção do cavalo, a glândula salivar sublingual tem também uma porção que se esvazia na carúncula sublingual no assoalho da boca por meio de um único canal sublingual que corre paralelo ao canal mandibular (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009).

#### 2.1.2 Controle

Os nervos parassimpáticos constituem a inervação eferente dos reflexos neurais que regulam a secreção salivar. Os fatores que estimulam a secreção salivar incluem a visão e o sabor do alimento, a presença de alimento na cavidade oral e os reflexos condicionados (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009).

O fluxo e a composição da saliva são regulados principalmente pela atividade do sistema nervoso autônomo: as glândulas serosas são controladas pelo sistema nervoso simpático e as glândulas seromucosas pelos sistemas simpático e parassimpático. A estimulação  $\alpha$  ou  $\beta$ -adrenérgica (neural/farmacológica) pode modificar a quantidade, viscosidade, proteína e as concentrações iônicas da saliva (APS; MARTENS, 2005; CHIAPPIN et al., 2007).

A estimulação  $\alpha$ -adrenérgica causa influxo de cálcio nas células secretoras, o que resulta em líquido com alta concentração de proteína. Devido à baixa presença de mucina, este tipo de saliva apresenta baixo volume e viscosidade (APS; MARTENS, 2005). Por outro lado, a estimulação  $\beta$ -adrenérgica resulta em fluidos com alto teor protéico, viscosidade, baixo volume e aspecto espumoso (CHIAPPIN et al., 2007). As glândulas mucosas recebem apenas estimulação colinérgica (parassimpático), que resulta em saliva com alto volume, rico em eletrólitos, baixa viscosidade e baixa concentração de proteína (APS; MARTENS, 2005).

Em humanos a contribuição das glândulas salivares na produção de saliva quando não ocorre estimulação é: submandibular 65%, parótida 20%, sublingual 5% e glândulas menores 10%, em comparação com estimulação artificial, quando a glândula parótida contribui com mais de 50% do total da secreção salivar (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).



O sistema nervoso simpático é o principal responsável pelas alterações nos componentes salivares durante o exercício (CHICHARRO et al., 1998), já que a atividade simpática é aumentada progressivamente com a atividade física (STAINSBY; BROOKS, 1990). A concentração iônica da saliva, principalmente dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, pode ser alterada variando de acordo com a duração e a intensidade do exercício. A estimulação simpática induzida por exercício físico e a desidratação determinam mudanças no fluxo salivar, na reabsorção e secreção de eletrólitos nas células secretórias, alterando assim a concentração de eletrólitos na saliva (CHICHARRO et al., 1998).

### 2.1.3 Composição

A saliva consiste de água, eletrólitos, muco e enzimas. A água e o muco suavizam e lubrificam a ingesta para facilitar a mastigação e a deglutição. A secreção salivar, assim como outras secreções digestivas, contém várias enzimas hidrolíticas destinadas a promoverem, mediante sua atividade catalítica, a degradação dos componentes alimentares, tornando-os adequados à absorção intestinal. As enzimas mais abundantes da secreção salivar são a alfa-amilase e a lisozima. A amilase atua digerindo o amido e está presente na saliva de onívoros, em grau limitado em cavalos, mas ausente em ruminantes e carnívoros. A lisozima é uma enzima com ação antibacteriana. (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009).

A saliva contém compostos que são sintetizados principalmente em células acinares e, em menor extensão, em células de conduto. Isto quer dizer que alguns componentes da saliva não estão relacionados a concentrações plasmáticas, mas estão relacionadas com as resposta glandular local. Além disso, a mudança na concentração de numerosos eletrólitos devido ao transporte iônico ativo torna a saliva hipotônica em relação ao sangue (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; APS; MARTENS, 2005). As concentrações dos componentes variam, sendo encontradas concentrações menores de sódio, magnésio e cloreto, concentrações maiores de potássio, cálcio, bicarbonato, fosfato e concentrações semelhantes de ácido úrico (UA) e ureia (APS; MARTENS, 2005).

Aproximadamente 99% da saliva é água e o outro 1% é um complexo de moléculas orgânicas e inorgânicas. A saliva de equinos é constituída por sódio (44,9 mmol/l), potássio (38,5 mmol/l), cloreto (39,4 mmol/l), magnésio (1,3 mmol/l), cálcio (3,8 mmol/l), fósforo (0,1 mmol/l), glicose (0,3 mmol/l), ureia (4,6 mmol/l) e proteína total (3,7 g/l (0,37 g/dL) (LEWIS, 2000).

A base da saliva é o fluido intersticial dos capilares sanguíneos, que entra através dos ductos das glândulas salivares, onde é modificado de isotônico para hipotônico (TURNER, 1993; SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007; PINK, SIMEK; VONDRAKOVA, 2010).

As glândulas salivares compreendem células acinares, dutos celulares e células mioepiteliais irrigadas por redes capilares, os vários acinos são ligados por canais intercalados e a saliva secretada é drenada para a cavidade oral por meio de canais estriados e excretórios. Nas células acinares, a saliva primária é secretada como um fluido isotônico em relação ao plasma (APS; MARTENS, 2005).

As glândulas salivares são classificadas como: serosas, mucosas e mistas. As glândulas serosas secretam um fluido líquido aquoso, em comparação com as glândulas mucosas, que secretam muco, um material viscoso que atua como um revestimento protetor para a superfície da membrana mucosa, a glândula mista produz fluidos mucosos e serosos (FRANDSON; WILKE; FAILS, 2009). Dependendo da glândula de origem, esta secreção pode ser serosa (parótida), mucosa (glândulas menores) ou mista (sublingual e submandibular) (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A saliva tem três funções principais: digestão, proteção e lubrificação, e também atua na manutenção da integridade dentária (SCHIPPER; SILLETTI; VINGERHOEDS, 2007; LINGSTRÖM; MOYNIHAN, 2003; VOSS, 2010; DODDS; JOHNSON; YEH, 2005).

A saliva é produzida e misturada com o alimento somente durante a mastigação. Por isso, o tempo de ingestão do alimento (que depende da estrutura e tamanho das partículas) tem grande influência no fluxo de saliva. Cavalos produzem 40-90 ml de saliva por minuto, pôneis 20-60 ml. A produção pode chegar a 100 litros por dia em um cavalo de porte médio (LEWIS, 2000). A produção varia também com o tipo de alimento. Por quilo de material fibroso é produzida muito mais saliva que por quilo de concentrado. A saliva dos equinos não contém enzimas digestivas, sendo seus constituintes mais expressivos minerais e bicarbonato, que provavelmente servem para uma neutralização dos ácidos formados na porção inicial do estômago. A saliva possibilita a deglutição e umedece o alimento de maneira que os sucos gástricos formados no estômago possam penetrar no bolo alimentar (MEYER, 1995).

Em estudo de Denny et al. (2008), foi realizada análise proteômica da saliva humana, sendo identificadas mais de 1000 proteínas e peptídeos. A maioria dos componentes da saliva é encontrada no plasma e alguns são produzidos e secretados unicamente nas glândulas salivares, sem correlação com os níveis sanguíneos.

#### **2.1.4 Aplicação clínica em humanos**

Os hormônios podem ser medidos na saliva de forma a permitir uma monitoração, inclusive observando-se as oscilações dos mesmos durante o dia, já que o desconforto para o paciente é reduzido (MOURA et al., 2007). A principal via de entrada dos hormônios esteroides 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; KÖHLER; TOPF, 2008). Hormônios ligados a proteínas séricas e globulinas formam grandes moléculas que não passam pelas membranas celulares das glândulas salivares. Conseqüentemente, apenas os hormônios não conjugados (fração livre) presentes no plasma, podem difundir em saliva. Assim, hormônios esteróides não conjugados (como cortisol, estriol, progesterona e testosterona) têm difusão predominantemente intracelular, não sendo influenciados pelo fluxo salivar e apresentam concentrações similares às do plasma (VINING; MCGINLEY; SYMONS, 1983).

O plasma é a principal fonte de secreções salivares e qualquer mudança no sangue de creatinoquinase isoforma mb (CK-mb) reflete em uma modificação, embora em menor grau, do conteúdo salivar deste biomarcador de infarto do miocárdio. A concentração salivar de CK-mb é significativamente maior em pacientes com infarto agudo do miocárdio ( $72,41 \pm 14,15$  UI/L) quando comparado a pacientes saudáveis ( $8,16 \pm 0,54$  UI/L). Usando o teste de correlação de Pearson, o resultado da correlação da concentração de CK-mb na saliva e no plasma foi de 0,92, sendo uma correlação forte (MIRZAI-DIZGAH et al., 2012).

Existe uma crescente tendência em estabelecer a saliva como meio de diagnóstico. É um método não invasivo, de baixo custo e fácil de usar, tendo várias vantagens sobre soro e urina em termos de coleta, armazenamento, transporte, volume da amostra e menor risco de contaminação para o operador quanto ao manuseio da mesma. A manipulação do fluido oral durante os procedimentos laboratoriais é muito mais fácil do que o sangue, porque não coagula, reduzindo assim o número de manipulações necessárias. A natureza não invasiva para abordagem de coleta de saliva pode reduzir drasticamente a ansiedade e desconforto e, assim, aumentar a disposição dos pacientes para fazer exames futuros (CHIAPPIN et al., 2007; LEE; WONG, 2009; MOURA et al., 2007, AHMADI MOTAMAYEL et al., 2010).

As concentrações de marcadores biológicos na saliva são inferiores quando comparados ao plasma e o fato de ainda não haver valores de referência é um problema a ser superado com o desenvolvimento de uma melhor metodologia para os exames (AHMANDI MONTAMAYEL et al., 2010).

Para estabelecer a saliva como meio alternativo ao plasma para ensaios biológicos, deve existir uma elevada correlação entre os parâmetros medidos do plasma e da saliva (HOWIE-ESQUIVIEL; WHITE 2008). Os estudos comparando resultados dos testes salivares com outros métodos de credibilidade científica comprovada, como dosagens sanguíneas de substâncias, têm tornado o método confiável, validando sua aplicabilidade (MOURA et al., 2007).

Na saliva, o ácido úrico é o antioxidante predominante, a albumina e o ascorbato, contribuem em menores proporções e a atividade antioxidante total da saliva correlaciona-se bem com a concentração salivar do ácido úrico (MOORE; CALDER; MILLER, 1994; MEUCCI et al., 1998). O ácido ascórbico e a vitamina E também constituem a defesa antioxidante salivar (NAGLER et al., 2002, RAI et al., 2007).

Ocorre aumento nos valores salivares de ácido úrico e capacidade antioxidante total quando comparados aos valores basais no exercício agudo seja ele resistido ou aeróbico (GONZALEZ; MARQUINA; RONDÓN, 2008).

As concentrações salivares de ureia (2,9 – 6,8 mmol/L) e ácido úrico (0,04 – 0,36 mmol/L) são similares às encontradas no sangue (REHAK; CECCO; CSAKO, 2000), sofrendo alterações metabólicas provenientes de enfermidades como disfunção renal (CARDOSO; ARREGGER; TUMILASCI, 2009) e gota (SOURKUP et al., 2012) além de síndrome metabólica (OWEN-SMITH; QUINEY; READ, 1998). As concentrações salivares de ureia podem subir drasticamente (6,1 - 29,6 mmol/L), acompanhando os valores séricos em indivíduos que apresentam comprometimento renal (CARDOSO et al., 2009).

Pequenas quantidades de bilirrubina, creatinina, glicose, colesterol e triacilgliceróis podem ser encontrados na saliva de indivíduos saudáveis (REHAK et al., 2000).

A concentração total de proteína (PT) pode ser quantificada na saliva com analisadores de bioquímica clínica sem qualquer modificação de método. A concentração de proteína total salivar em humanos é de  $0,41 \pm 0,012$  g/L, e a de ácido úrico salivar é de  $0,068 \pm 0,001$  mmol/L. Contudo, a concentração de PT salivar é 10 a 15 vezes menor em relação ao plasma e a correlação de proteína total e ácido úrico na saliva e plasma é fraca (NUNES; BRENZIKOFER; MACEDO, 2011).

A saliva desempenha um papel central na patogênese do carcinoma oral de células escamosas. A análise de vários componentes oriundos da mucosa oral e orofaríngea, bem como de componentes oriundos do soro, permite a avaliação de alterações locais e sistêmicas no organismo. A análise salivar também pode ser utilizada para diagnosticar alterações específicas relacionadas a doenças, tais como marcadores tumorais epiteliais, o que é um indicador do carcinoma oral de células escamosas (DRENT et al., 1996).

A atividade de lactato desidrogenase (LDH) aumentada no soro pode ser utilizada como um marcador de necrose. O intervalo de referência para LDH na saliva é maior do que no plasma em indivíduos saudáveis. A atividade LDH aumenta na doença periodontal em relação aos indivíduos saudáveis (DE LA PEÑA; DIOS; SIERRA, 2007).

O estudo realizado por Haghgoo et al. (2016) evidenciou maior concentração salivar de LDH em pacientes com periodontite ( $1072 \pm 731$  UI/L) do que indivíduos com periodonto normal ( $550,9 \pm 217$  UI/L). Assim, o nível salivar de LDH pode ser utilizado como marcador de destruição periodontal para o diagnóstico de doença periodontal.

Quando comparado o resultado de LDH entre pacientes com carcinoma oral de células escamosas e pacientes saudáveis, o valor de LDH para pacientes com essa enfermidade oral

foi de  $1225 \pm 222$  UI/L e para pacientes normais foi de  $497 \pm 51,8$  UI/L (LOKESH; KANNABIRAN; RAO, 2016).

Para a saliva poder ser utilizada como ferramenta de diagnóstico para a maioria dos hormônios presentes no plasma, é necessária uma correlação entre as concentrações plasmáticas e nas glândulas salivares (CHIAPPIN et al., 2007). Assim, é preciso distinguir uma variedade de componentes salivares que são biomarcadores úteis para detectar mudanças da saúde corporal, já que existe um crescente interesse na utilização de análises salivares no diagnóstico de doenças sistêmicas e na monitoração da saúde geral (MOURA et al., 2007). Deste modo muitos métodos estão disponíveis hoje para o diagnóstico de câncer, porém mais ênfase é dada a um método não invasivo e um teste preciso para o diagnóstico. A saliva é um potencial e importante meio diagnóstico podendo ser usado como uma etapa adjuvante para o diagnóstico de cânceres orais e pré-cânceres (MASSANO et al., 2006).

Em estudo realizado por Sayedda e Ahmed (2012), foi verificado que a atividade antioxidante total no soro foi significativamente maior ( $p < 0,0001$ ) do que a da saliva. Esta diminuição parece ser proporcional à gravidade da doença e pode ser observada uma boa correlação entre o processo da doença e o nível total de atividade antioxidante total. O nível total de atividade antioxidante do soro e da saliva pode ser usado para mapear a gravidade da doença e sua progressão/regressão.

Youssef; Groussard; Machefer (2008) demonstraram que a capacidade antioxidante salivar total de triatletas diminuiu significativamente no final do quando comparado com o início do período de treinamento. Outro composto importante a ser aplicado em esportes é o lactato. Alguns estudos analisaram a resposta do lactato salivar em uma tentativa de determinar a intensidade da formação ou de correlação entre sangue e lactato salivar (CHICHARRO et al., 1998; OHKUWA et al., 1995). Nenhuma mudança foi observada no lactato salivar durante o exercício aeróbio comparado com período de repouso (LINDNER et al., 2000).

Para a coleta de saliva a boca deve estar limpa, sem presença de alimentos e líquidos (exceto água) por pelo menos 30 minutos antes da coleta. A limpeza da boca com água limpa (de preferência destilada) ajuda a eliminar os resíduos que podem dificultar a análise (CHIAPPIN et al., 2007).

De acordo com Nunes e Macedo (2013) o uso de saliva em testes laboratoriais tem grande potencial, embora ainda seja necessário padronizar alguns métodos como o sistema de coleta, levando em conta a substância a ser quantificada, os horários de coleta, volume, recuperação de amostras e prevenção de contaminação com sangue de lesões da mucosa oral. A falta de correlação entre algumas substâncias presentes na saliva e sangue não exclui a possibilidade de utilizar este fluido em laboratórios, embora seja necessário estabelecer os intervalos de referência específicos por meio de métodos com pequenas modificações nas técnicas para maximizar sensibilidade.

As concentrações salivares dos biomarcadores são geralmente muito baixas, por isso há uma demanda pelo desenvolvimento de métodos analíticos específicos e sensíveis (NUNES et al., 2015).

### **2.1.5 Aplicações em equinos**

Na avaliação do lactato salivar, Lindner et al. (2000) observaram que não há relação entre a concentração de lactato no plasma e na saliva, o sangue continua a ser o substrato de escolha para diagnóstico de desempenho em equinos.

A avaliação de cortisol salivar é uma técnica válida e não invasiva para medição, podendo tornar-se o fluido corporal de escolha para monitorar o estresse em equinos

(PEETERS et al., 2011) e a concentração de cortisol salivar é um parâmetro sensível para indicar aumentos agudos em secreção de cortisol (SCHMIDT et al., 2010).

## 2.2 Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Os equinos são muito utilizados para atividades esportivas que requerem um bom desempenho destes animais. Os cavalos atletas são constantemente submetidos a exercícios físicos intensos e técnicos, podendo levar ao desenvolvimento de lesões de caráter oxidativo que ocorrem quando há produção excessiva de radicais livres e/ou quando os sistemas antioxidantes celulares se tornam ineficientes no controle e eliminação dessas substâncias (SILVEIRA, 2005). O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a defesa antioxidante do organismo é conhecido como estresse oxidativo (URSO; CLARKSON, 2003; KIRSCHVINK; MOFFARTS; LEKEUX, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande instabilidade e por isso elevada reatividade, e tendem a ligar o elétrons não pareados com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). A reatividade dos radicais livres promove alta toxicidade, sendo capaz de reagir com diversas moléculas orgânicas como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, provocando danos em nível celular e tecidual, levando a alterações estruturais (JIMÉNEZ et al., 2005). As ERO são constantemente formadas no organismo, por exemplo, durante a fagocitose realizada pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos, no combate a microrganismos invasores (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989) (Quadro 1).

**Quadro 1:** Redução do oxigênio a espécies reativas de oxigênio (ERO)

Reação	Substância resultante
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$	Radical superóxido
$O_2^{\cdot -} + H_2O \rightarrow HO_2^{\cdot -} + OH$	Radical hidróperóxido
$H O_2^{\cdot -} + e^- + H \rightarrow H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- \rightarrow \cdot OH + OH^-$	Radical hidroxila

Existem ERO muito prejudiciais, tais como o radical hidroxila (OH), que reagem indiscriminadamente com a maioria dos compostos orgânicos essenciais à integridade e função dos organismos vivos - as biomoléculas, exercendo efeitos biológicos prejudiciais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Na atividade física intensa há um aumento de 10 a 20 vezes no consumo total de oxigênio e um aumento de 100 a 200 vezes na captação de oxigênio pelo tecido muscular (MILLS; SMITH; HARRIS, 1997), favorecendo o aumento da produção de ERO. Um atleta humano de elite consome oxigênio a uma taxa de 70 mL/kg/min., enquanto um cavalo pode consumir oxigênio em uma taxa tão alta como 200 mL/kg/min. Isto sugere que o cavalo tem potencial significativo para o estresse oxidativo durante o exercício e deve ter defesas antioxidantes bem desenvolvidas para lidar com estes níveis elevados de ERO (KINNUNEN; HYYPPA; LEHMUSKERO, 2005).

Embora o cavalo apresente grande capacidade de transporte de oxigênio, em situações de grande esforço físico como em atividades esportivas, estarão submetidos a situações de

estresse oxidativo com potencial para o desenvolvimento de lesões, que afetarão principalmente os músculos do animal. O confinamento, o mau condicionamento e as competições podem levar os cavalos a situações de estresse que não ocorreriam na vida selvagem, favorecendo a ocorrência de injúrias oxidativas (KINNUNEN et al., 2005).

Modalidades esportivas em que a obtenção de energia é predominantemente decorrente do metabolismo aeróbio apresentam, mais facilidade de promover a liberação dessas substâncias em comparação com aquelas em que a energia é obtida através do metabolismo anaeróbio. Com isso, os atletas humanos ligados a modalidades aeróbias sofrem mais as consequências de ERO (GOLDFARD, 1999), isto parece ocorrer da mesma forma em equinos atletas (SOFFLER, 2007). Estudos em cavalos de enduro evidenciaram a ocorrência de dano muscular associado à depleção de compostos antioxidantes como a vitamina C, glutathiona (GSH) e glutathiona-peroxidase (GPx) (AVELLINI; CHIARADIA; GAITI, 1999; HARGREAVES et al., 2002). Em cavalos de corrida observou-se diminuição de compostos antioxidantes, mas não se observou evidências de dano muscular (CHIARADIA et al., 1998).

As ERO tem a habilidade de oxidar e danificar diretamente DNA, proteínas e lipídeos. Além do dano direto a macromoléculas, as ERO funcionam como moléculas de sinalização, ativando diversos mecanismos celulares sensíveis ao estresse, que levam a danos celulares (EVANS et al., 2003).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) das membranas celulares são rapidamente atacados por radicais oxidantes. A destruição oxidativa dos AGPI, conhecida como peroxidação lipídica, é bastante lesiva por ser uma reação de autopropagação na membrana (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Para a homeostasia corporal e para o adequado funcionamento do sistema antioxidante é importante o aumento na síntese de ERO. Assim, a resistência a novos estresses promovida pela realização de exercícios físicos aeróbios ou anaeróbios ocorre, pois existe uma elevação gradativa na produção de ERO, efeito conhecido como adaptação ao treinamento (CRUZAT et al., 2007).

A lipoperoxidação é um dos mais significativos fenômenos causados pelas ERO, embora os danos aos ácidos nucleicos, carboidratos e às proteínas também têm grande importância biológica. O malondialdeído (MDA) é um dos mais importantes produtos finais da lipoperoxidação e sua dosagem normalmente é aceita como um índice da intensidade de lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CHIARADIA et al., 1998). Adicionalmente, a mensuração da capacidade antioxidante total (TAS) nos fluidos biológicos é considerada um quantificador total de antioxidantes presentes nos fluidos e verifica a capacidade de proteger a membrana e outros componentes celulares contra dos danos oxidativo (FICICILAR et al., 2003).

O MDA é o marcador de dano oxidativo relacionado à atividade física mais estudado, já que durante a prática do exercício o aumento de consumo de oxigênio favorece a lipoperoxidação (DEATON; MARLIN, 2003).

Tem sido relatada uma grande variação nos valores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que incluem o MDA em cavalos, incluindo valores tão baixos quanto 2 nmol/L (WHITE, et al. 2001) a 7000 nmol/L (MCMENIMAN; HINTZ, 1992). Em equinos, a concentração de TBARS no plasma antes do exercício apresentou grande variação 66 a 1048 nmol/L (MARLIN et al., 2002). White et al. (2001) observaram que em cavalos não treinados da raça PSI a concentração de TBARS foi de  $1,7 \pm 0,1$  nmol/L.

O MDA em cavalos representa mais de 90% da concentração de TBARS (MARLIN et al., 2002), e os valores encontrados na literatura divergem. No estudo de Avellini et al. (1999) a concentração média de MDA em cavalos não treinados foi de 120 nmol/L. A concentração sérica de MDA em equinos da raça Puro Sangue Árabe sem treinamento e em repouso foi de  $1,07 \pm 0,67$  nmol/mL (YONEZAWA et al., 2010), em cavalos de polo em repouso a

concentração de MDA foi de 0,15-0,89 nmol/L com mediana 0,30 (WEIGEL et al., 2013). Bariani Junior (2015) observou concentração de  $62,08 \pm 7,30$  nmol/g para MDA em cavalos saudáveis sem raça definida. Fernandes et al. (2012) observaram em cavalos da raça American Trotter em repouso valores de MDA variando de 0,56 a 1,06  $\mu\text{mol/L}$  com média de 0,89  $\mu\text{mol/L}$ . Aranzales (2012) encontrou  $117,84 \pm 108,57$   $\mu\text{g/ml}$  de concentração de MDA em equinos sem raça definida.

Em cavalos infectados com *Theileria equi* e *Babesia caballi* foi observado por Deger et al. (2009) uma concentração elevada de MDA ( $1,58 \pm 0,15$  nmol/mL). Os autores sugeriram que estes níveis aumentados se devem ao aumento na peroxidação lipídica podendo ser um indicador de estresse oxidativo e de lesão eritrocitária causada pela babesiose.

## 2.3 Fisiologia e Bioquímica no Exercício

No início do exercício, catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) aumentam a quebra de glicogênio nos músculos. No fígado, catecolaminas, junto com o cortisol, aumentam a glicemia ativando a quebra do glicogênio e gliconeogênese. Cortisol e catecolaminas também aumentam a mobilização de ácidos graxos livres das reservas de gordura (HYYPÄ, 2005).

A produção de energia para a função muscular se dá através de dois mecanismos diferentes: um aeróbico, que utiliza como substratos ácidos graxos livres e glicose, e outro anaeróbico, que utiliza como substrato a desfosforilação da fosfocreatina, a glicólise anaeróbica com formação de lactato e desaminação de purinas. No entanto, apesar de pouco eficiente, a porção anaeróbica da glicólise supre rapidamente a necessidade energética mesmo em condições de baixas concentrações de oxigênio intracelular (VALBERG, 2008).

Uma forma de se avaliar o metabolismo muscular é a observação dos níveis de lactato e das enzimas AST, CK (ANDERSON, 1975; HESS, 2000) e LDH (CÂMARA E SILVA; DIAS; SOTO-BLANCO, 2007). Com o exercício há o aumento das concentrações das enzimas de função muscular e do lactato sanguíneo. Esse método também foi utilizado para avaliação de lesões musculares (HESS, 2000). Essas alterações diminuem quando o animal é submetido a repetições do exercício, principalmente em se tratando da CK que pode ser usada como índice de avaliação da aptidão ao exercício (ANDERSON, 1975).

### 2.3.1 Creatinoquinase (CK)

A enzima CK é produzida no miocárdio, no músculo esquelético e no cérebro. Esta enzima converte o ATP e creatina em ADP e fosfocreatina. Sua análise é comumente realizada para detecção de rabdomiólise por esforço. Os cavalos com rabdomiólise por esforço podem apresentar uma concentração de CK plasmática entre 10 e 900 vezes maior que a concentração basal. Em alguns casos, o exercício extenuante pode causar elevações de CK sem evidenciar sintomas de dano muscular devido ao processo de acidose das células musculares o que aumenta a permeabilidade das membranas (BAYLY; KLINE, 2007).

A fosfocreatina é um composto fosfatado de alta energia estocado na musculatura esquelética. Apesar de suas concentrações produzirem ATP em apenas alguns segundos durante o exercício, ela é importante tanto no início quanto no fim dos exercícios de cargas máximas (POSO et al., 2004). Essa fonte de energia é rapidamente esgotada, devido ao baixo acúmulo na fibra muscular (VOTION et al., 2008, VALBERG, 2008).

A enzima responsável por esse mecanismo de obtenção de energia é a CK, uma enzima de meia-vida plasmática curta de aproximadamente 108 minutos (VALBERG, 2008). Ela tem seu pico de atividade entre 4 e 6 horas após o esforço muscular devido ao extravasamento por aumento de permeabilidade celular e sua concentração plasmática cai

rapidamente após esse pico, devido a características de meia-vida intrínsecas a enzima (HESS, 2000; SANTOS, 2006).

Mesmo a CK sendo mais específica como indicativo de lesão muscular, quando comparada à AST, a determinação simultânea de AST e CK em equinos tem potencial valor diagnóstico e prognóstico, em função das diferentes taxas de retorno aos valores basais de atividade sérica ou plasmática. Aumentos na atividade sérica de CK indicam que a lesão muscular é ativa ou recente. A persistência dos valores elevados de CK demonstra que a lesão muscular continua ativa. A meia vida dessa enzima apresenta valores menores que 24 horas, enquanto os valores para a AST podem ser de sete a oito dias (SILVA; DIAS; SOTO-BLANCO, 2007).

Apesar de serem encontradas altas atividades séricas de CK após o exercício, esses ocorrem devido à mudança na permeabilidade da membrana celular, possivelmente em função de hipóxia e podem ser considerados fisiológicos (THOMASSIAN et al., 2007). Mesmo exercícios leves podem gerar hipóxia muscular em animais mal condicionados, sendo então esperada elevação de maior magnitude na atividade dessa enzima em relação a um animal bem condicionado fisicamente. Com um programa de treinamento é possível que o aumento da atividade das enzimas musculares alcance valores menores (HARRIS; MAYHEW, 1998).

Os valores de referência para CK são de aproximadamente 147 UI/l para equinos da raça Puro Sangue Inglês e 18-217 UI/l para equinos de trote (ROBINSON, 2003). Em cavalos de enduro treinados para percurso de 140 km, os valores de CK tiveram mediana de 222 IUI/L com intervalo de 157 – 538 IUI/L e os valores de AST mediana de 368 IUI/L com intervalo de 284 – 563 IUI/L (MARLIN et al., 2002), cavalos da raça Crioula em treinamento apresentam valores médios de 159 UI/L (FRANCISCATO et al., 2006), enquanto Pritchard et al. (2009), descreveram valores oscilando entre 123 e 358 UI/L para equinos sadios e em repouso.

Em estudo realizado com cavalos de enduro foi verificada atividade de CK de  $1417,25 \pm 790,93$  UI/L em animais que apresentaram problemas metabólicos no decorrer do percurso, sendo eliminados. Já para os animais que concluíram a prova a atividade de CK foi de  $187,33 \pm 57,68$  UI/L (ADAMU, et al., 2012 b).

### **2.3.2 Aspartato aminotransferase (AST)**

A AST, assim como outras transferases, age no processo de desaminação, onde há o uso de aminoácidos como substrato para obtenção de energia. As elevações dos níveis de AST estão relacionadas à necrose miofibrilar. Devido a sua meia-vida, ela se mantém com concentrações aumentadas no sangue durante semanas, enquanto a CK retorna ao normal em poucos dias após lesões musculares (VALBERG, 2008).

A AST é uma enzima em altas concentrações nas células hepáticas, no músculo cardíaco e no músculo esquelético. Deve-se ter cuidado na interpretação do aumento da atividade de AST para distinguir se a origem é muscular ou hepática. Os cavalos com dano muscular apresentam uma atividade plasmática de AST entre 5 e 100 vezes maior. Sua meia vida é maior que da CK, sendo de 7 dias com um pico em torno de 24 horas. Assim como a CK, a AST também pode apresentar aumentos normais logo após o exercício (BAYLY; KLINE, 2007).

Em animais de enduro em repouso foi observada uma atividade de AST aumentada ( $547,55 \pm 423,35$  UI/L) em cavalos que apresentaram problemas metabólicos no decorrer do percurso, sendo eliminados. Já para os cavalos que concluíram a prova a atividade de AST foi de  $283,37 \pm 63,02$  UI/L (ADAMU et al., 2012b).

Em cavalos de enduro treinados para percurso de 140 km, os valores de AST apresentam intervalo de 284 a 563 IUI/L (MARLIN et al., 2002) e de 189 a 456 UI/L.



(PRITCHARD et al., 2009). Em cavalos da raça Crioula em repouso a atividade média de AST foi 209 UI/L (FRANCISCATO et al., 2006).

### **2.3.3 Lactato desidrogenase (LDH)**

O lactato muscular tem origem na glicólise anaeróbica (NELSON; COX, 2008, COTTA; FERREIRA, 1994). O lactato é gerado para evitar o acúmulo de piruvato e gerar NAD para facilitar a glicólise, e ainda serve como ânion no tamponamento do hidrogênio acumulado, sendo extremamente importante em exercício de alta intensidade para manutenção do equilíbrio ácido-base. O piruvato é transformado em lactato através da enzima lactato desidrogenase (LDH) no citoplasma da célula (VALBERG, 2008).

A LDH é uma enzima ubíqua que catalisa a reação da produção de lactato através da redução do piruvato durante a glicólise anaeróbia. Dentro da célula, a glicose é usada principalmente para a produção de piruvato na via da glicólise. Em condições aeróbicas, o piruvato entra na matriz mitocondrial, onde é oxidado pela ação da piruvato desidrogenase, sendo transformado em acetil-CoA. LDH é uma enzima detectável no citoplasma de quase todas as células do corpo humano, que se torna extracelular após a morte celular. Portanto, sua presença extracelular está sempre relacionada à necrose celular e à ruptura do tecido (LIAW et al., 1997). Sua atividade sérica aumenta em muitas condições patológicas tais como enfarte do miocárdio, doença hepática (particularmente elevada em hepatite tóxica com icterícia), anemia megaloblástica, doença renal (especialmente em doentes com necrose tubular ou pielonefrite), doenças malignas (doença de Hodgkin, carcinoma do abdome e pulmão, teratoma, metástases hepáticas ou leucemia), distrofia muscular progressiva e embolia pulmonar. Consequentemente, a concentração de LDH na saliva, como expressão de necrose celular, pode ser um indicador específico para lesões orais que afetam a integridade da mucosa oral. Além disso, pode existir uma possível correlação entre os níveis de LDH salivar e a agressividade da lesão oral de carcinoma oral de células escamosas, já que a taxa mitótica de lesões mais agressivas é maior e, portanto, a LDH salivar também deve aumentar (LIAW et al., 1997).

A LDH na saliva é predominantemente (75%) proveniente do fluido crevicular gengival, das células epiteliais bucais, do refluxo gastrointestinal e da precipitação celular, e em menor proporção origina-se de glândulas salivares maiores e menores (8,2% da glândula parótida e 14,7% das glândulas submandibular e sublingual) (NAGLER et al., 2001).

O perfil isoenzimático de LDH é diferente entre a saliva e o plasma. As isoenzimas de LDH 4 e 5 predominam na saliva enquanto que as isoenzimas 1 e 2 predominam no soro. Em humanos as isoenzimas 4 e 5 na saliva correspondem respectivamente a 9,3 e 7,8 vezes o valor plasmático enquanto a LDH1 e a LDH2 são, respectivamente 3,2 e 1,3 vezes mais concentradas no plasma. A LDH total na saliva é 2,8 vezes maior que no plasma. (NAGLER et al., 2001).

Na literatura podem-se observar valores de referência desta enzima para equinos: 252 UI/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997), 162 a 412 UI/L (MEYER; COLES; RICH, 1997), 631 UI/L em cavalos da raça Crioula em treinamento (DA CÃS et al., 2000), 421 UI/L (FERNANDES, 1994). Em equinos treinados para concurso completo de equitação o valor médio basal de LDH foi de 511,15 UI/L (SOUZA 2013).

### **2.3.4 Lactato**

O lactato é utilizado na produção de energia na porção aeróbica da glicólise, dando origem a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. A porção não utilizada para a produção de energia passa para outros tecidos através de difusão e por transporte ativo através de transportadores monocarboxilados

(HINCHCLIFF; GEOR, 2004). O lactato é um intermediário importante em diversos processos metabólicos e é usado como combustível para o metabolismo aeróbico em todo o organismo, e talvez um mediador redox entre os diversos compartimentos intra ou extracelulares (GLADDEN, 2004).

O lactato por si só é uma excelente fonte de energia, pois tem mais de 90% da energia potencial da glicose. Em equinos, os principais tecidos que utilizam o lactato são o fígado, que converte lactato a glicose e o coração, onde ele é utilizado diretamente como fonte de energia. Também há utilização do lactato como fonte energética pelas fibras musculares tipo I durante o exercício (POSO et al., 2004).

Em exercício de carga máxima, o metabolismo oxidativo de produção de energia chega ao máximo, necessitando da energia gerada pelo metabolismo anaeróbico e desaminação do ADP. O glicogênio é utilizado como fonte de energia em exercício intenso, levando ao acúmulo de lactato (VALBERG, 2008).

A concentração de lactato sanguíneo é comumente utilizada como uma fonte adicional para avaliação do condicionamento físico do atleta. É uma variável que pode ser avaliada com facilidade em testes a campo devido à utilização de lactímetros portáteis (GOMIDE et al., 2006).

Uma das formas de avaliação do desempenho equino é a mensuração do lactato sanguíneo. O parâmetro que apresenta melhor correlação com parâmetros de desempenho como premiação, posicionamento de chegada e vitórias, é a velocidade em que se chega a concentração de 4 mMol/L de lactato também chamada de VL4 (CASINI et al., 1996). O VL4 é utilizado para avaliar a capacidade aeróbica muscular (D'ANGELIS et al., 2005; FERRAZ et al., 2006; FERRAZ et al., 2008; FERRAZ et al., 2010).

Em cavalos da raça puro sangue inglês em repouso os valores de referência de lactato sanguíneo variam de 2,5 a 15,5 mmol/dL (ROBINSON, 2003).

Equinos de raça, sexo e idade variadas treinados para Concurso Completo de Equitação, apresentaram valores basais médios de 1,50 mmol/l (GOMIDE et al., 2006). Em cavalos da raça Puro Sangue Inglês, o valor médio basal de lactato plasmático de animais treinados é de 1,7 mmol/l e em animais sem treinamento 2,1 mmol/l (NOGUEIRA et al., 2002). Equinos trotadores apresentam valores basais médios para o lactato plasmático de 0,52 mmol/l (PINKOWSKI et al., 1998). Em cavalos de enduro que apresentaram problemas metabólicos no decorrer do percurso, sendo eliminados foi verificada concentração de lactato de  $8,59 \pm 2,67$  mmol/L. Já para os animais que concluíram a prova, a concentração de lactato foi de  $1,03 \pm 0,21$  mmol/L (ADAMU et al., 2012b).

### 2.3.5 Ácido úrico

Nos mamíferos, o ácido úrico é produto secundário de excreção, derivado das bases purínicas. Na maioria dos tecidos orgânicos encontra-se na forma de ânion urato, sendo capaz de proteger o DNA e lipídios da ação de ERO (LARSON, 1997; NIETO et al., 2000).

A ação antioxidante do urato pode ser resumida pela reação com a maioria dos agentes oxidantes em velocidade superior a das outras purinas. Nessa reação, há formação do radical urato estabilizado. O urato reage rapidamente com o radical hidroxila ( $\text{HO}^\cdot$ ), no entanto, o urato é inerte às espécies superóxido ( $\text{HOO}^\cdot$ ), radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ), peróxidos ( $\text{ROOH}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Não é capaz de desativar o oxigênio singleto  $^1\text{O}_2$  isoladamente, porém no meio biológico ele causa indiretamente sua desativação através da desativação de outras espécies excitadas. Sua reação mais importante é com os radicais peroxila ( $\text{ROO}^\cdot$ ) e  $\text{NO}_2^\cdot$  (gerando  $\text{NO}_2^-$ ). Essa grande atividade contra os radicais peroxila é a base efeito antioxidante protetor do DNA e de lipídios (NIETO et al., 2000).

O aumento de ácido úrico é uma possível causa de desclassificação, baixa performance e problemas de saúde em cavalos de enduro (ADAMU et al., 2012a).

Em cavalos da raça Mangalarga Marchador a pasto, a concentração de ácido úrico para animais em repouso foi de 0,48 mg/dL (ABRANTES, 2013), cavalos treinados para enduro de 140 Km, a concentração de ácido úrico antes do exercício em foi de 7,3 a 17,4  $\mu\text{mol/L}$  (MARLIN et al., 2002).

Cavalos de enduro que concluíram a prova a concentração de ácido úrico foi de  $7,67 \pm 6,47 \mu\text{mol/l}$ , animais que apresentaram problemas metabólicos no decorrer do percurso, sendo eliminados a concentração de ácido úrico em repouso foi de  $78,11 \pm 52,94 \mu\text{mol/l}$ . Na competição de enduro o animal precisa manter o sistema gastrointestinal, respiratório, cardíaco e músculo-esquelético funcionando adequadamente, além disso, esses cavalos precisam manter a frequência cardíaca igual ou abaixo de 64 batimentos/minuto nos pontos de avaliação veterinária e apresentar excelente grau de hidratação após 20-30 minutos do período de recuperação (ADAMU et al., 2012b).

Cavalos Puro Sangue Inglês treinados para a prova de 2000 metros, em repouso, apresentaram concentração de ácido úrico de  $0,30 \pm 0,00 \text{ mg/L}$ , já para a provas de 1000 e 2000 metros ocorreu um aumento de 1,1% e 2,18% (YOO et al., 2007).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Comitê de Ética**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em pesquisa – CEUA/UFRRJ, sob o protocolo 013/2015, de acordo com a Lei 11794 08 de outubro de 2008.

### **3.2 Local**

A coleta de material foi realizada no setor de equideocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), as análises hematológicas e bioquímicas no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) do Departamento de Parasitologia Veterinária e no Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

### **3.3 Valores de Referência para Biomarcadores Salivares**

#### **3.3.1 Animais**

Foram utilizados equinos da raça Mangalarga Marchador provenientes do criatório da UFRRJ com idade entre 3 e 15 anos e escore corporal entre 4 e 5 segundo critérios estabelecidos por Henneck et al. (1983). Os animais foram separados por idade: sendo jovens animais com idade de 3 a 4 anos e adulto com idade de 5 a 18 anos (PRICE et al., 1995).

Inicialmente os animais foram submetidos a exame físico conforme Feitosa (2014), sendo incluídos apenas animais sem evidências de enfermidades infecciosas, parasitárias e metabólicas, considerados saudáveis.

#### **3.3.2 Amostragem**

Para determinação do número de indivíduos necessários para estabelecer intervalos de referência, com nível de segurança, sem qualquer condicionante foi estabelecido o número de 120 indivíduos. Porém, uma amostragem maior que 40 animais pode ser empregada, quando uma distribuição gaussiana é observada (FRIEDRICHS et al., 2005). Neste estudo foi avaliado um total de 60 animais.

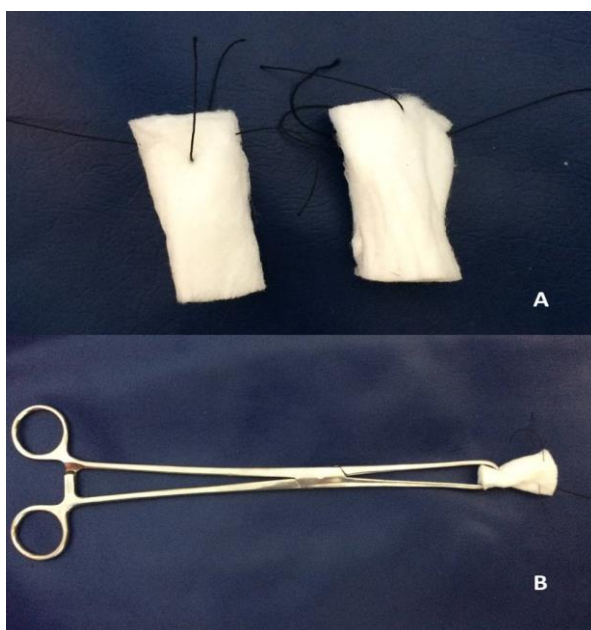
### **3.4 Coleta das Amostras de Saliva**

Para a coleta da amostra de saliva, o animal foi contido por cabresto, sendo sua cavidade bucal lavada com água corrente, mantendo-se o fluxo de água até que não se observasse presença de substâncias sólidas, como capim e ração (Figura 1).

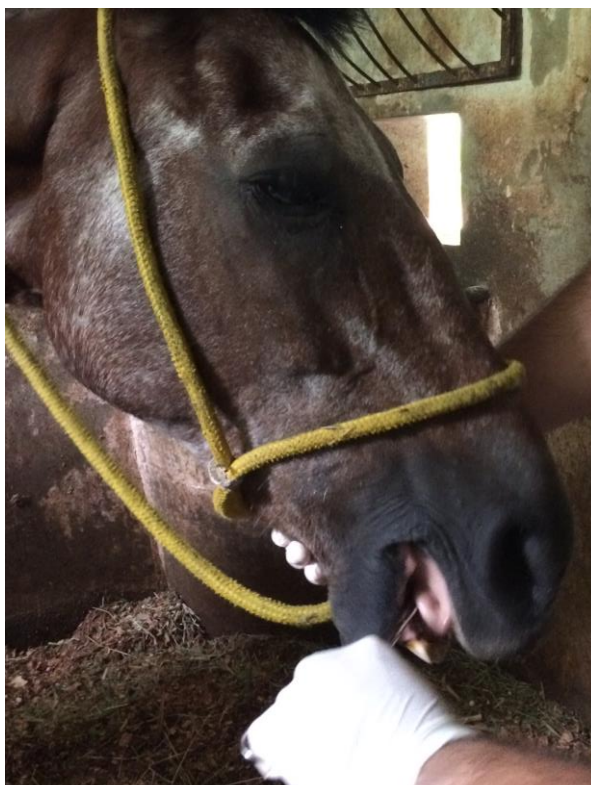


**Figura 1.** Equino contido com cabresto para lavagem da cavidade bucal com água corrente para remoção de substâncias sólidas da boca e saliva.

Após 10 minutos de realizada a limpeza da cavidade bucal, um rolo de algodão hidrófilo, fixado de forma asséptica em uma das extremidades por fio cirúrgico em forma de cruz, mantendo-se duas pontas de 2,5 cm, foi inserido, com auxílio de uma pinça hemostática longa (Figura 2) junto à mucosa jugal no espaço interdental (região da barra) e na região sublingual (próximo ao frênulo lingual), onde desemboca o ducto mandibular e mantido por um minuto (Figura 3).



**Figura 2.** Algodão hidrófilo fixado de forma asséptica em uma das extremidades por fio cirúrgico em forma de cruz (A). Pinça hemostática longa para auxiliar na coleta de saliva através do algodão hidrófilo (B).



**Figura 3.** Pinça com algodão posicionado na região sublingual do cavalo.

Após um minuto, com auxílio da pinça, o algodão foi removido e acondicionado em um tubo de fundo cônico de polipropileno (Figura 4) e este armazenado em caixa isotérmica contendo gelo durante o transporte até o Laboratório de Pesquisa Clínica, no Instituto de Veterinária da UFRRJ.



**Figura 4.** Algodão hidrófilo em tubo de plástico de fundo cônico, capacidade de 10 mL, mantido posicionado por fios de linha fixados externamente na tampa rosqueada.

No Laboratório, o frasco contendo o algodão foi centrifugado, a 2000g, por cinco minutos, utilizando-se centrífuga clínica. Para centrifugar as pontas dos fios de algodão ficaram para fora do tubo e após a tampa ser rosqueada o algodão ficou fixo na parte superior do tubo (Figura 5).



**Figura 5.** Saliva de equino em frasco cônico de 10 mL após centrifugação

Após a centrifugação, o algodão foi removido com auxílio de uma pinça e a saliva colhida com pipeta automática de 1 mL, foi acondicionada em tubos tipo *ependorfs* e armazenada a -20 °C para posterior análise.

### 3.5 Amostras de Sangue

Amostras de sangue foram colhidas em três frascos a vácuo de 4 mL, contendo os anticoagulantes EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)<sup>1</sup> e EDTA/fluoreto de sódio<sup>2</sup>, e em frascos sem anticoagulante<sup>3</sup>, por punção venosa da jugular, utilizando-se agulha calibre 30 x 0,7mm imediatamente após a limpeza da boca.

O sangue foi mantido em temperatura de refrigeração e transportado até o LPC, onde o material foi processado. No laboratório os frascos de contendo anticoagulante foram centrifugados a 2000g e o plasma sobrenadante foi acondicionado em tubos estéreis do tipo

<sup>1</sup> Vacuum II®, Labnew, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup> BD Vacutainer® Systems, Becton Dickinson, England

<sup>3</sup> Hemogard® K3 Vacutainer Systems, Becton Dickinson, England.

*ependorff* em alíquotas de 2,0 mL, e em seguida armazenado em temperatura de 20 °C negativos para análises posteriores.

Os frascos contendo sangue colhido sem anticoagulante foram mantidos inclinados até a completa retração do coágulo e em seguida centrifugados a 2000g. O soro resultante foi armazenado em alíquotas de 2,0 mL, armazenado a 20 °C negativos.

### **3.6 Análises Laboratoriais**

#### **3.6.1 Hematologia**

Os hemogramas foram realizados com a finalidade de confirmar a condição clínica dos animais, considerados saudáveis ao exame clínico.

Amostras de sangue com EDTA foram encaminhadas em temperatura de refrigeração para realização de hemograma, no LQEPV, utilizando-se contador automático de células.

A contagem global de hemácias ou hematimetria (células x 10<sup>6</sup>/μL), o volume globular (%), a concentração de hemoglobina (g/dL), a leucometria global (células x 10<sup>3</sup>/μL) e a contagem total de plaquetas (células/μL) foram determinadas em contador eletrônico de células<sup>4</sup>. Os índices hematimétricos Volume Corpuscular Médio (VCM – fL), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM - %) e Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) foram calculados pelo próprio aparelho considerando as contagens de hemácias, o hematócrito e a taxa de hemoglobina.

A morfologia eritrocitária e a leucometria específica (percentual de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos, monócitos e basófilos) foram avaliadas em esfregaço sanguíneo corado com Panóptico Rápido, com auxílio de microscópio óptico, objetiva de 100x conforme Jain (1993).

A determinação de proteína plasmática total (PPT) foi realizada utilizando refratômetro manual. A determinação do fibrinogênio foi realizada subtraindo-se o valor de leitura em refratômetro manual após a desnaturação do fibrinogênio em banho-maria a 37° C do valor obtido da PPT.

#### **3.6.2 Análise bioquímica e metabolismo oxidativo**

Alíquotas de soro e saliva foram descongeladas em temperatura ambiente e analisadas em espectrofotômetro digital semi-automático<sup>5</sup> (Figura 6), utilizando-se kits comerciais, segundo especificação do fabricante. Foram determinadas as concentrações de a atividade das enzimas lactato desidrogenase<sup>6</sup>, aspartato aminotransferase<sup>7</sup> e creatinoquinase<sup>8</sup> por ensaio cinético, a concentração de ácido úrico por método enzimático<sup>9</sup> e a concentração de proteína total por método colorimétrico<sup>10</sup>.

---

<sup>4</sup> Poch100/Roche

<sup>5</sup> Thermo Scientific Multiskan GO, Uniscience, São Paulo, Brasil

<sup>6</sup> Biosystems - MAK 066

<sup>7</sup> Biosystems - MAK 055

<sup>8</sup> Biosystems - MAK 116

<sup>9</sup> Biosystems – A12521

<sup>10</sup> Biosystems – 11800





**Figura 6.** Analisador automatizado de acesso randômico para realização de dosagens bioquímicas e turbidimétricas, por leitura fotométrica (A15, Biosystems, Barcelona, Espanha).

O lactato plasmático e salivar foi determinado por método enzimático, utilizando-se kit comercial<sup>11</sup> no LQEPV da UFRRJ.

A concentração de malondealdeído (MDA) foi mensurada por meio da determinação da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma de acordo com o método proposto por Rey et al. (2013), porém com adaptação onde ao invés de ácido perclórico como desproteinizante foi usado ácido tricloracético. Sendo assim adicionou-se 300 microlitros de ácido tricloracético a 10% (diluído em água destilada) em 700 microlitros de amostra, seguindo-se de agitação no vórtex por um minuto e logo após submetido a centrifugação a 2000g por 5 minutos. O sobrenadante isento de proteína foi recolhido e misturado numa proporção 1:2 com reagente de ácido tiobarbitúrico (TBA) (TBA 0,026 M e ácido tricloroacético 0,92 M em 250 mL de água com 62,5 mL de HCl 1 M). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 600g durante 10 min a 4 °C, após a centrifugação as amostras foram colocadas em placa de 96 poços com o fundo chato e a concentração determinada em espectrofotômetro semiautomático<sup>12</sup> com absorvância 532 nm. As concentrações de TBARS foram calculadas utilizando  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  como coeficiente de absorção molar. Os resultados foram expressos como micromoles de MDA por mililitro de plasma e saliva.

A capacidade antioxidante total foi mensurada por ensaio colorimétrico<sup>13</sup> utilizando-se kit comercial.

### 3.7 Análises Estatísticas

#### 3.7.1 Cálculo dos intervalos de referência

Para estabelecer os intervalos de referência para ácido úrico, concentração de proteínas totais, e lactato foram utilizadas 60 amostras de saliva de animais fisicamente saudáveis. Foram seguidos os critérios da Sociedade Internacional de Patologia Clínica Animal. Para detecção de *outliers* foi aplicado o algoritmo de Horn (SOLBERG, 1987; HORN et al., 2001).

<sup>11</sup> Lactato Bioclin-K084

<sup>12</sup> Multiskan Go; ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland

<sup>13</sup> Antioxidant Assay Kit - Sigma-Aldrich® – referência CS0790

Este método utiliza limites interquartis de Tukey para identificar *outliers* localizados nas extremidades superior ou inferior (HORN; PESCE, 2003, 2005). Como critério de rejeição os valores externos aos limites interquartis (IG) foram  $Q1 - 1,5 * IQR$  e  $Q3 + 1,5 IQR$  (IQR= intervalo interquartil =  $Q3 - Q1$ , onde  $Q1$  e  $Q3$  são os percentis 25 e 75, respectivamente).

Após a exclusão dos *outliers*, os dados foram analisados pelo *Software Reference Value Advisor Freeware* (GEFFRE et al., 2011), recomendado pela Sociedade Americana de Patologia Clínica Veterinária (FRIEDRICHS et al., 2005).

### **3.7.2 Cálculo de MDA**

Para análise estatística referente ao MDA foi utilizado o programa *Reference Value Advisor V2.1* onde o método de transformação de dados utilizado foi o *Cox Box* quando os dados eram não normais e o método de Kernel para dados que não puderam ser normalizados. A correlação foi feita através do teste de Spearman para os dados não normais. Foram definidas equações de regressão linear para estimar níveis plasmáticos e séricos de MDA a partir dos níveis salivares. As análises foram realizadas com nível de significância estatística fixado em  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

Os valores de PT, ácido úrico e lactato, bem como a atividade das enzimas AST, CK e LDH, no soro e na saliva de equinos apresentaram grande variação, e em todas as substâncias houve valores “discrepantes” ou atípicos (*outliers*), que são valores muito afastados de grande parte dos dados, os quais foram identificados por método estatístico e eliminados. Dessa forma, após a exclusão dos *outliers*, que podem apontar anormalidades do conjunto de dados ou erros na medição realizada foram apresentados os dados trabalhados, sem os *outliers*.

Após a separação por idade segundo Price et al. (1995) não foi verificada diferença estatística entre as faixas etárias para as variáveis MDA no plasma ( $p=0,29$ ), no soro ( $p=0,67$ ) e na saliva ( $p=0,08$ ); CK no soro ( $p=0,46$ ) e saliva ( $p=0,96$ ); LDH no soro ( $p=0,67$ ) e saliva ( $p=0,97$ ); AST no soro ( $p=0,81$ ) e saliva ( $p=0,59$ ); PT no soro ( $p=0,78$ ) e saliva ( $p=0,66$ ); ácido úrico no soro ( $p=0,35$ ) e saliva ( $p=0,25$ ); lactato no plasma ( $p=0,11$ ) e saliva ( $p=0,15$ ).

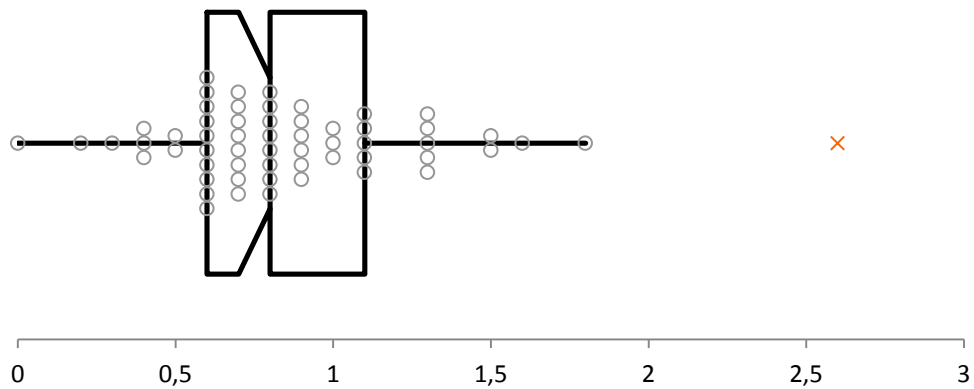
### 4.1 Proteína Total

Como demonstrado na Figura 7, na maioria das amostras de saliva, a concentração total de proteínas ficou entre 0 e 2,6 g/dL (média  $0,9 \pm 0,4$  g/dL), com dispersão ampla dos dados representada pela assimetria da distribuição e valores atípicos. Após serem eliminados os *outliers*, obtiveram-se valores mais representativos da concentração de PT na saliva com a maioria dos dados no intervalo entre 0,5 e 1,0 g/dL conforme a Figura 8. Assim, os valores obtidos para PT na saliva variaram entre 0,3 e 1,8 g/dL com média de 0,9 g/dL (Tabela 1).

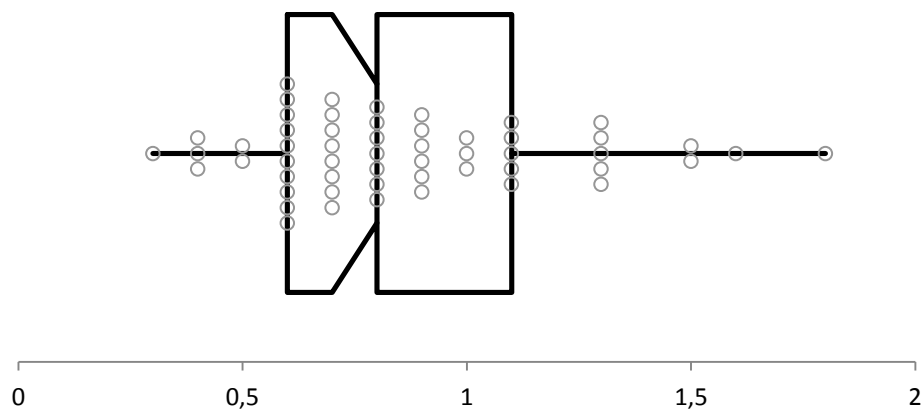
**Tabela 1.** Média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da concentração de proteína (g/dL) no soro e saliva de equinos.

		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Correlação
Dados brutos	Saliva	0,9	0,4	0,8	0	2,6	0,041
	Soro	6,4	0,8	6,5	3,2	8,4	
Sem de <i>outliers</i>	Saliva	0,9	0,3	0,8	0,3	1,8	-0,031
	Soro	6,4	0,8	6,5	5,1	7,4	

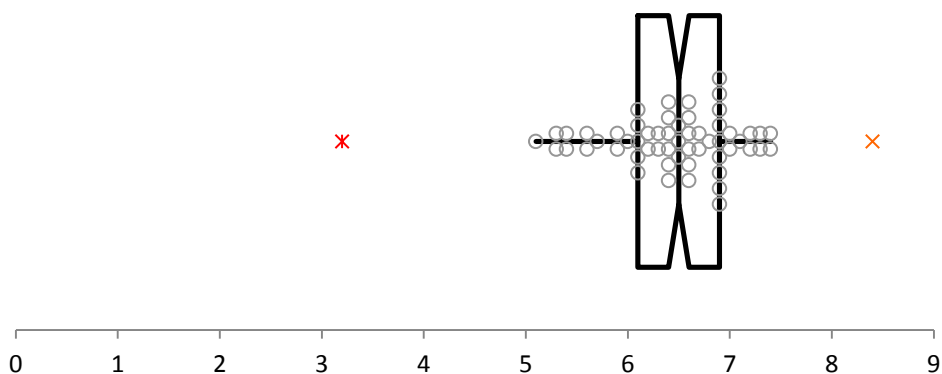
No soro as concentrações de PT variaram de 3,2 a 8,4 g/dL com média de  $6,4 \pm 0,8$  g/dL, sendo evidenciados valores de 3,2 e 8,4 g/dL, abaixo e acima da grande maioria dos dados, portanto atípicos (Figura 9). Após a eliminação destes dados manteve-se a média em  $6,4 \pm 0,8$  g/dL (Figura 10) com variação entre 5,1 e 7,4 g/dL (Tabela 1). Observa-se que a concentração de PT no soro foi 7,1 vezes maior que na saliva. A correlação entre os valores de PT no soro e na saliva foi negativa fraca (-0,031).



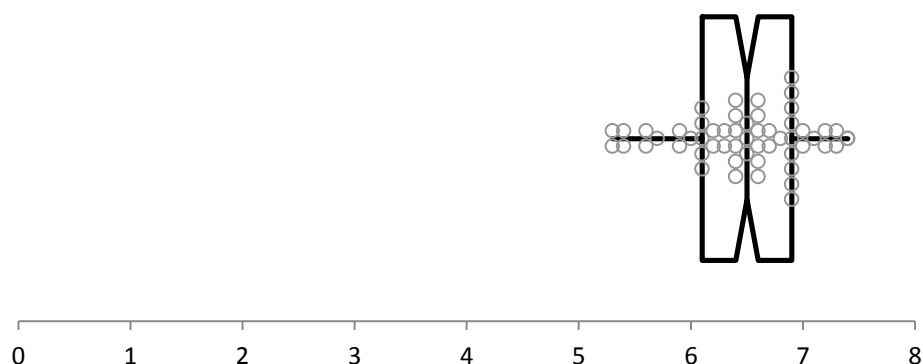
**Figura 7.** Box-Plot dos valores de proteína total na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos, evidenciando em vermelho à direita um valor atípico (outlier).



**Figura 8.** Box-Plot dos valores de proteína total na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após a eliminação de outliers (n=55).



**Figura 9.** Box-Plot dos valores de proteína total no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos. Observa-se à direita e esquerda valores atípicos (outliers).



**Figura 10.** Box-Plot dos valores de proteína total no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após exclusão dos *outliers* n=55.

## 4.2 Ácido Úrico

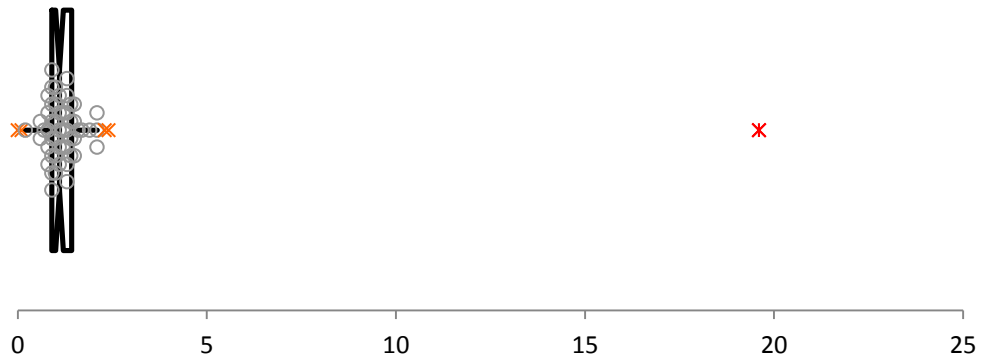
A distribuição dos dados referentes ao ácido úrico (Figura 11) indica uma concentração dos valores próximos à zero, porém tendo dados muito acima de 19,6 e abaixo (0,0 mg/dL) da maioria dos valores. Eliminados os dados atípicos (Figura 12) os valores encontrados para o ácido úrico na saliva variaram entre 0,6 e 2,1 mg/dL com média de  $1,2 \pm 0,4$  mg/dL.

No soro a média do ácido úrico foi de  $0,8 \pm 0,2$  mg/dL (Tabela 2), sendo observada a presença de apenas um dado discrepante próximo de 2,0 mg/dL (Figura 13), que após eliminado, resultou em valores entre 0,5 e 1,2 mg/dL com média de  $0,78 \pm 0,16$  mg/dL (Figura 14) para melhor compreensão os dados encontram-se na Tabela 2, sendo a concentração média na saliva quase o dobro da concentração obtida no soro, ainda que os valores mínimos tenham sido próximos.

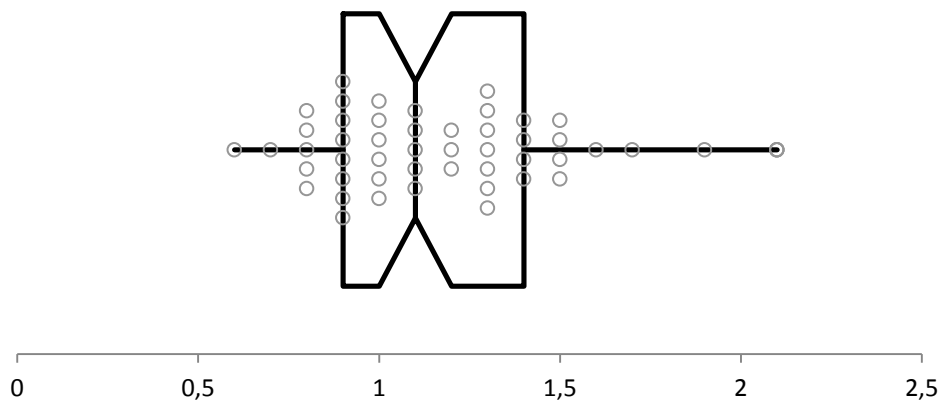
Da mesma forma que para a PT, a correlação entre a concentração de ácido úrico na saliva e no soro foi negativa e fraca (-0,057).

**Tabela 2.** Média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação de ácido úrico (mg/dL) entre saliva e soro.

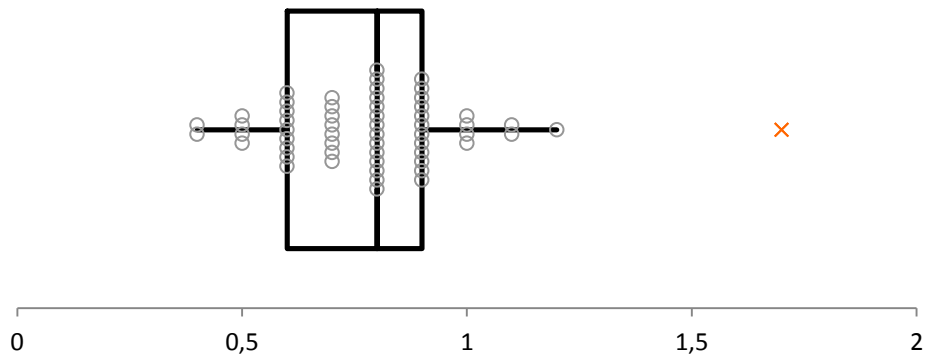
		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Correlação
Dados brutos	Saliva	1,8	3,4	1,1	0	19,6	-0,321
	Soro	0,8	0,2	0,8	0,4	1,7	
Sem <i>outliers</i>	Saliva	1,2	0,4	1,1	0,6	2,1	-0,057
	Soro	0,78	0,16	0,8	0,5	1,2	



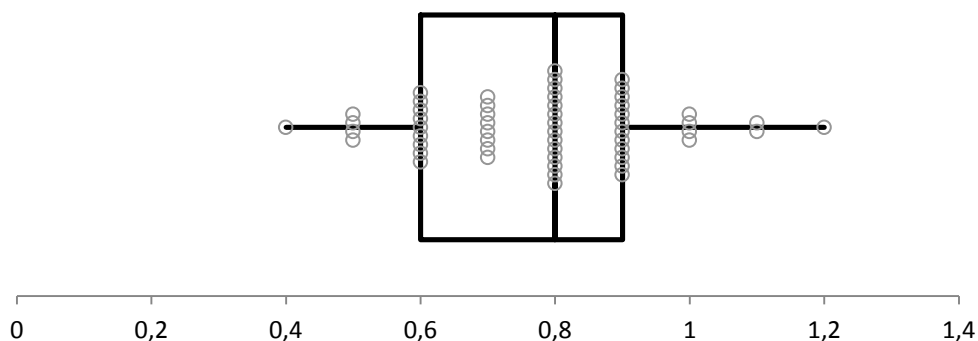
**Figura 11.** Box-Plot dos valores de ácido úrico na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos. Observa-se à direita e à esquerda a presença de valores atípicos (*outlier*).



**Figura 12.** Box-plot dos dados de ácido úrico na saliva de equinos, após eliminação de *outliers* n=55.



**Figura 13.** Box-Plot distribuição dos valores de ácido úrico no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos. Observa-se à direita valor atípico (*outlier*).



**Figura 14.** Box-Plot distribuição dos valores de ácido úrico no soro de equinos após a exclusão de *outliers* n=55.

### 4.3 Aspartato Aminotransferase (AST)

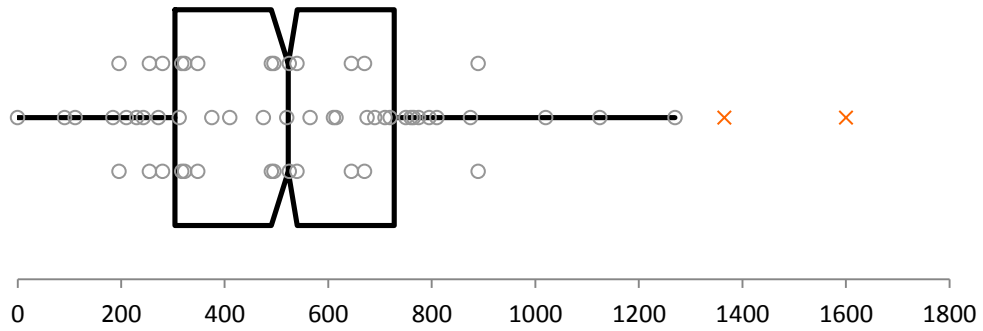
Os valores obtidos para a AST na saliva variaram entre zero e 1600 UI/L com média de  $550 \pm 320$  UI/L e mediana em 522 UI/L obtendo-se, contudo uma ampla dispersão e valores muito acima e abaixo da média e mediana (Figura 14). Após a eliminação dos *outliers*, obteve-se uma média de  $528 \pm 259$  UI/L e mediana de 520 UI/L para esta enzima na saliva, com a maioria dos dados entre 400 e 600 UI/L (Figura 16).

No soro a atividade da AST foi de  $368 \pm 100$  UI/L com mediana de 358 UI/L antes da eliminação dos dados atípicos (Figura 17) e média de  $385 \pm 74$  UI/L (mediana de 375 UI/L) após a eliminação dos valores atípicos (Tabela 3).

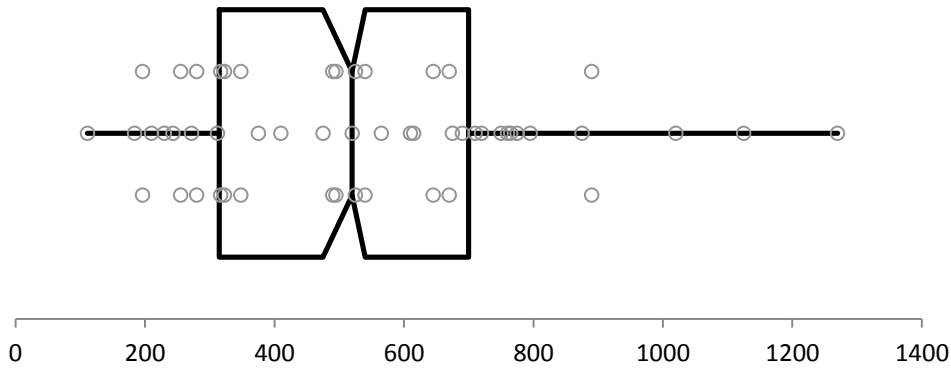
Para a atividade da AST, obtiveram-se valores médios entre saliva (528 UI/L) e soro (385 UI/L) relativamente próximos (Tabela 3). Na saliva a atividade dessa enzima variou entre 111 e 1270 UI/L, e no soro entre 74 a 545 UI/L podendo ser observada na Figura 18 a dispersão dos dados na saliva. Ainda que próximas, as concentrações da AST no soro e na saliva apresentaram correlação fraca, e diferentemente da PT e do ácido úrico a correlação foi positiva (0,066).

**Tabela 3.** Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade da enzima AST (UI/L).

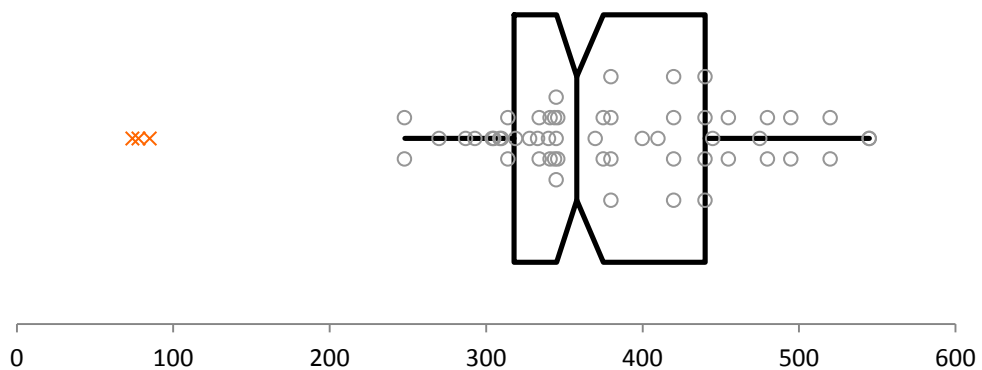
		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Correlação
Dados brutos	Saliva	549,6	320,3	522,5	0	1600	0,065
	Soro	367,7	99,9	358,0	74	545	
sem <i>outliers</i>	Saliva	528	259	520	111	1270	0,066
	Soro	385	74,8	375	74	545	



**Figura 15.** Box-Plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados brutos evidenciando à direita valores atípicos (*outleirs*).

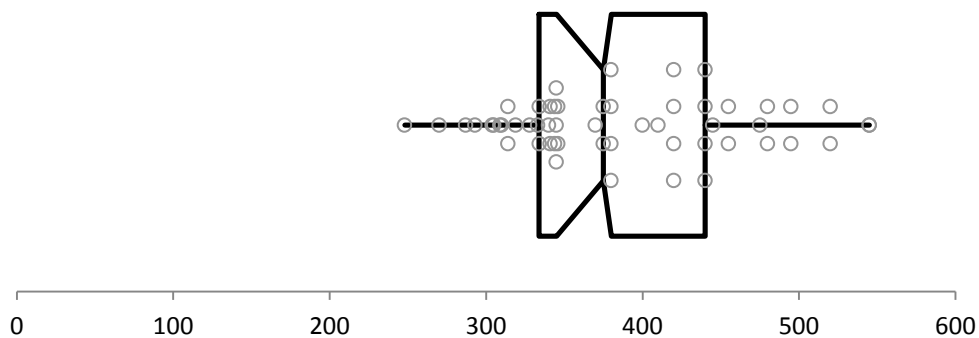


**Figura 16.** Box-plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) na saliva de equinos, após eliminação de *outleirs* (n=54).



**Figura 17.** Box-Plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à esquerda valores atípicos (*outleirs*).





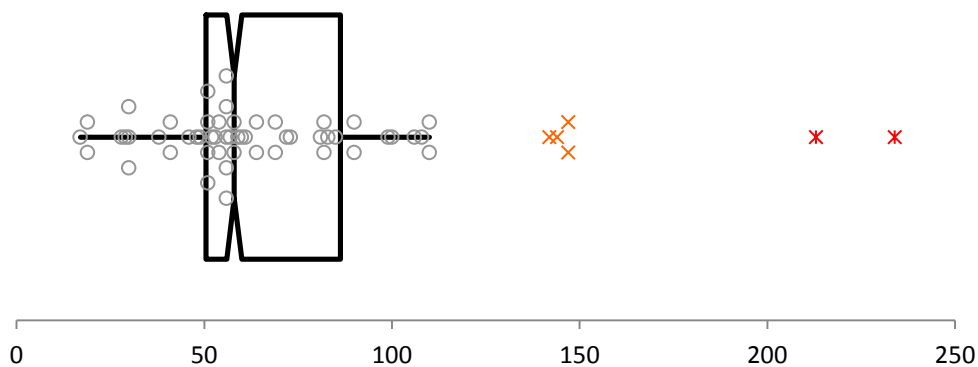
**Figura 18.** Box-Plot dos valores de AST no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após a exclusão de *outliers* (n=54).

#### 4.4 Creatina Quinase (CK)

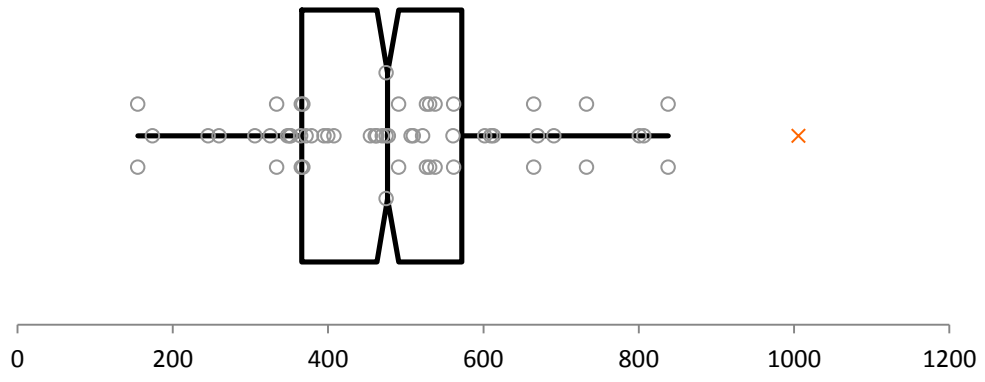
Na avaliação dos dados brutos referentes á atividade da enzima CK foram observados valores discrepantes tanto na saliva (Figura 19) quanto no soro (Figura 20), sendo excluídos esses dados.

Observa-se que atividade da CK foi 7,9 vezes maior no soro ( $492 \pm 163$  UI/L) que saliva ( $63 \pm 22$  UI/L), com valores máximos de 110 UI/L e 838 UI/L e mínimos de 29,2 e 155 UI/L (Tabela 4), respectivamente para saliva (Figura 21) e soro (Figura 22).

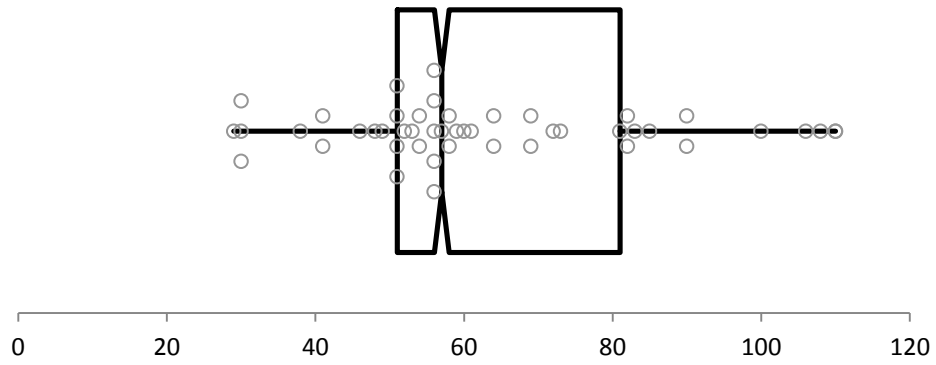
Como na maioria dos parâmetros uma correlação negativa fraca (-0,253) foi observada para a concentração dessa enzima entre soro e saliva.



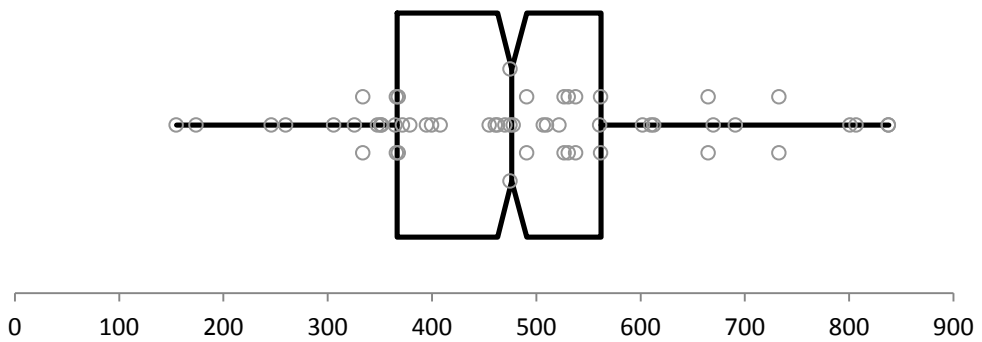
**Figura 19.** Box-plot dos dados da enzima creatino quinase (CK) na saliva de equinos, com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à direita valores atípicos (*outliers*).



**Figura 20.** Box-Plot dos valores de aspartato aminotransferase (AST) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à direita valor atípico (*outliers*).



**Figura 21.** Box-plot dos dados da creatino quinase (CK) na saliva de equinos, após eliminação de *outliers* (n=56).



**Figura 22.** Box-plot dos dados da da creatino quinase (CK) no soro de equinos, após eliminação de valores atípicos (n=56).

**Tabela 4.** Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade da enzima CK (UI/L).

		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Correlação
Dados brutos	Saliva	63	22	57	29	110	-0,253
	Soro	491,7	162,9	478	155	838	
Sem <i>outliers</i>	Saliva	72,1	42,7	58	17	234	-0,209
	Soro	492,2	1758	476,5	155	1006	

#### 4.5 Lactato Desidrogenase (LDH)

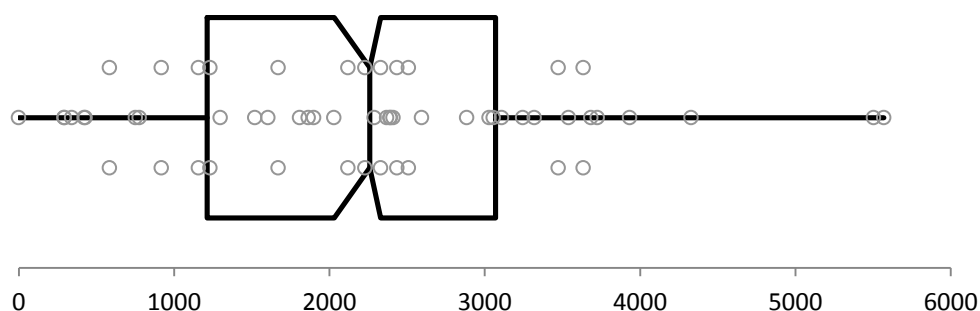
Os valores encontrados para a LDH na saliva variaram entre zero e 5.570 UI/L com média de  $2195 \pm 1259$  UI/L (Tabela 5). No soro o menor valor obtido foi 150 UI/L e o máximo foi igual ao da saliva (5570 UI/L) com média de  $1236 \pm 1081$  e mediana de 943 UI/L. A dispersão dos dados de LDH na saliva (Figura 23) e no soro (Figura 24) revela valores distantes da maioria dos dados.

No soro após a exclusão dos *outliers* os dados se concentraram entre 800 e 1000 UI/L (Figura 25) como média em  $934 \pm 192$  UI/L e na saliva (Figura 26) a concentração ficou entre 1000 e 3000 UI/L com média de  $2268 \pm 1218$  UI/L, sendo a atividade da LDH, portanto bem maior na saliva que no soro.

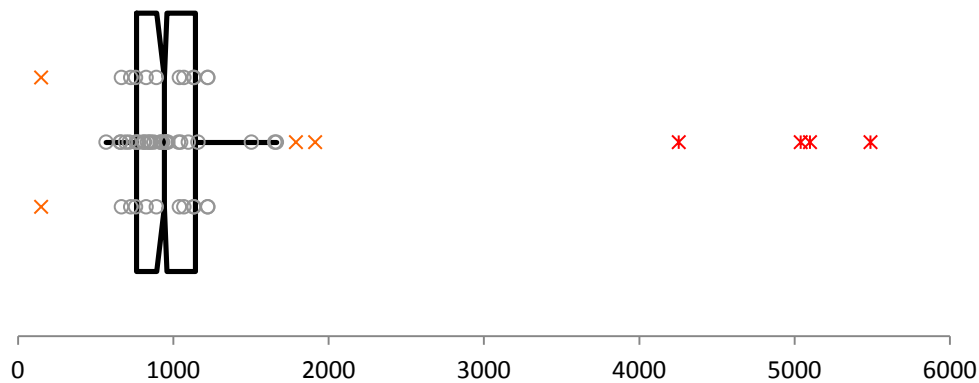
Para os valores de LDH entre saliva e soro obteve-se uma correlação negativa fraca (-0,058).

**Tabela 5.** Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade da enzima LHD (UI/L).

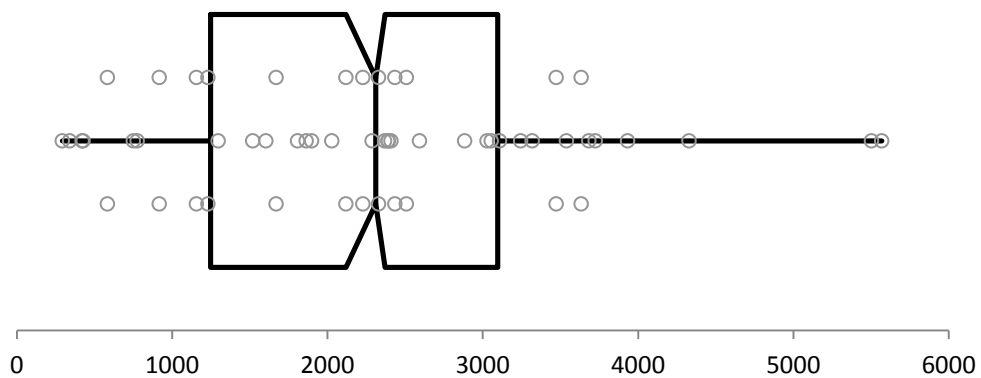
		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Correlação
Dados brutos	Saliva	2195,1	1259,1	2260	0	5570	-0,194
	Soro	1235,8	1080,5	942,5	150	5570	
Sem <i>outliers</i>	Saliva	2268,2	1218,2	2310	294	5570	-0,058
	Soro	934,0	192,0	917,0	568	1505	



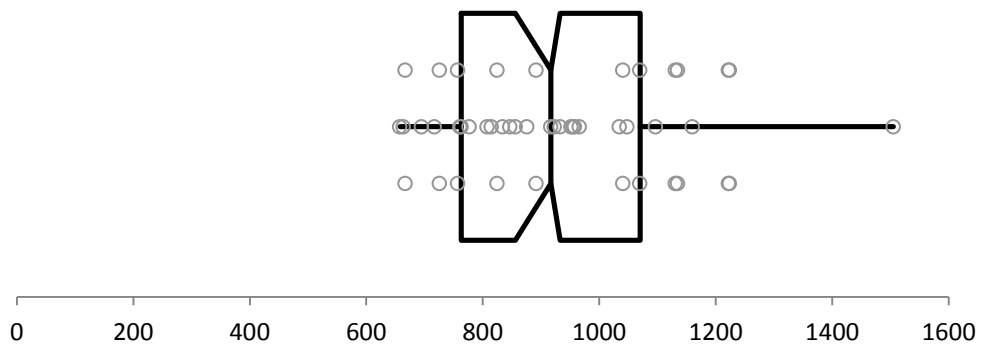
**Figura 23.** BoxPlot dos valores da enzima lactato desidrogenase (LDH) na saliva de equinos antes da retirada dos valores atípicos.



**Figura 24.** Box-Plot dos valores de lactato desidrogenase (LDH) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se a presença de dados atípicos (*outliers*).



**Figura 25.** Box-Plot dos valores de lactato desidrogenase (LDH) na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após exclusão de *outlier* (n=56).



**Figura 26.** Box-Plot dos valores de lactato desidrogenase (LDH) no soro de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados após a exclusão de *outliers* (n=56).

## 4.6 Lactato

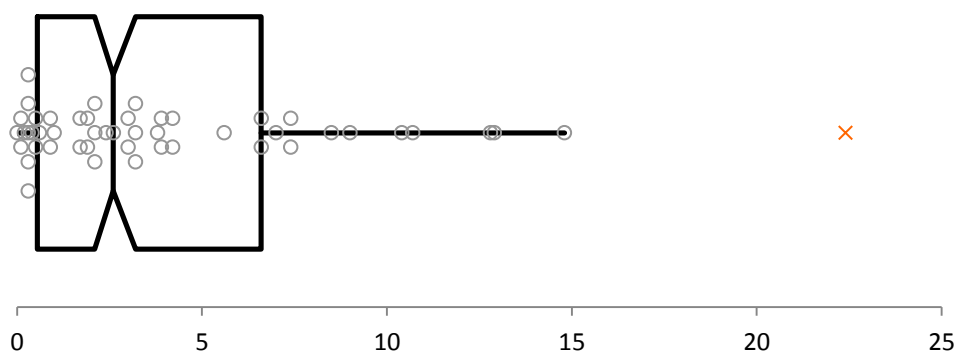
O lactato, derivado do ácido láctico, produzido no metabolismo de queima da glicose (glicólise), para o fornecimento de energia na ausência de oxigênio, apresentou valores médios (4,1 mmol/L) e mediana iguais (2,6 mmol/L) na saliva e no soro, com variações entre 0 e 22,4 mmol/L na saliva e entre 0 e 27,4 mmol/L no soro (Tabela 6).

Na saliva, antes e após a eliminação dos *outliers* os valores médios foram próximos (4,1 e 3,9 mmol/L, respectivamente antes e após), enquanto que no soro, com a eliminação dos valores atípicos houve um decréscimo da concentração média desse metabólito (de  $4,1 \pm 5$  mmol/L para  $2,4 \pm 1,2$  mmol/L), bem como da mediana (2,2 mmol/L).

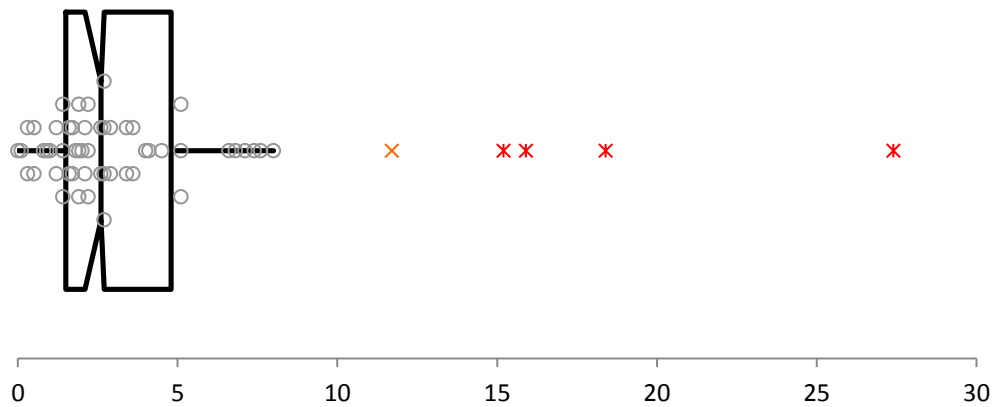
**Tabela 6.** Valores de média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos e correlação da atividade do lactato (mmol/L).

		Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	Correlação
Dados brutos	Saliva	4,1	4,6	2,6	0	22,4	0,094
	Soro	4,1	5	2,6	0	27,4	
Sem <i>outliers</i>	Saliva	3,9	3,9	2,6	0,1	14,8	0,07
	Soro	2,4	1,2	2,2	0,5	5,1	

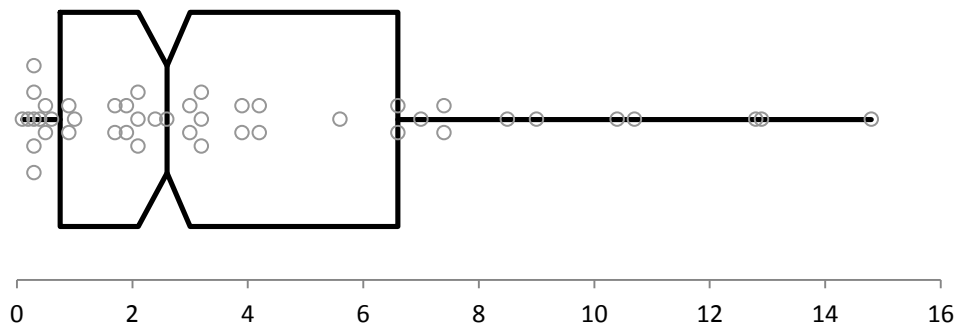
Os dados de lactato na saliva representados na Figura 26 revelam valores dispersos entre 0,0 e 22 mmol/L e a maioria dos dados entre 1,0 e 4,0 mmol/L. No plasma a dispersão ocorreu entre 0 e 27 mmol/L (Figura 27). As variações observadas após eliminação dos dados atípicos ocorreram entre 0,1 e 14,8 mmol/L na saliva (Figura 28) e 0,5 mmol/L e 5,1 mmol/L no plasma (Figura 29).



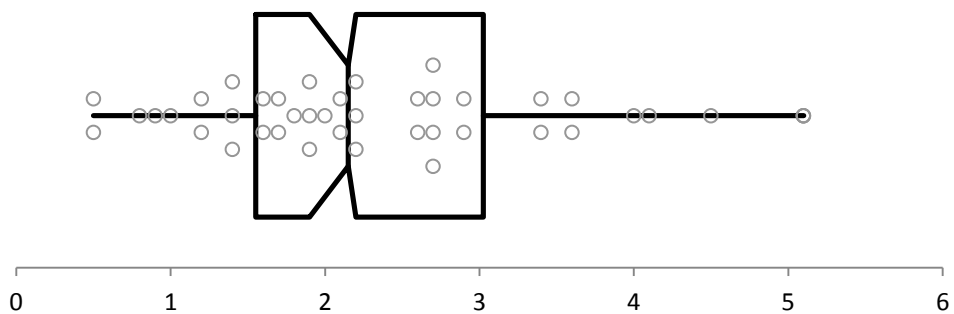
**Figura 27.** Box-Plot dos valores de lactato na saliva de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se à direita dados discrepantes (*outliers*).



**Figura 28.** Box-Plot dos valores de lactato no plasma de equinos com representação da mediana e dispersão dos dados. Observa-se dados discrepantes (*outliers*).



**Figura 29.** Box-plot dos valores de lactato na saliva de equinos, após eliminação de *outliers* (n=50).



**Figura 30.** Box-plot dos valores de lactato no plasma de equinos, após eliminação de valores atípicos (n=50).

Com valores médios não muito discrepantes, a correlação desse metabólito entre soro e saliva foi negativa fraca (-0,07), como na maioria das demais substâncias avaliadas no presente estudo.

#### 4.7 Malondialdeído (MDA) - Capacidade Antioxidante (Estresse Oxidativo)

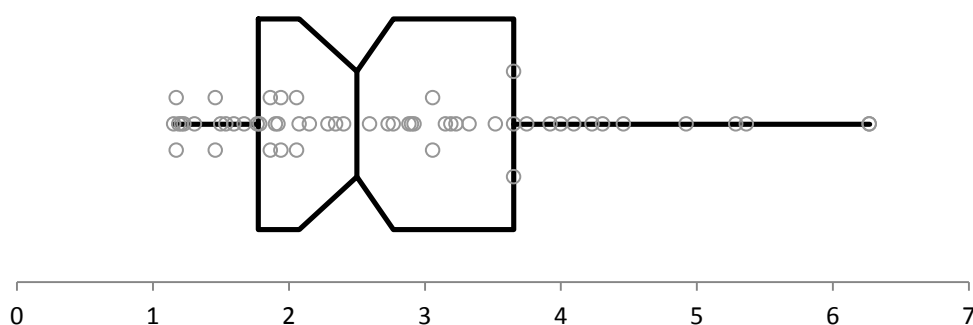
Para o MDA, um biomarcador de estresse oxidativo no plasma, obteve-se mediana de 2,5  $\mu\text{mol/mL}$  e valores mínimo e máximo de 1,15  $\mu\text{mol/mL}$  e 6,2  $\mu\text{mol/mL}$ , respectivamente. Os valores no soro foram inferiores aos plasmáticos, com mediana de 1,5  $\mu\text{mol/mL}$ , valores mínimo 1,06  $\mu\text{mol/mL}$  e máximo de 5,67  $\mu\text{mol/mL}$ . Na saliva a mediana foi menor que no plasma e maior que no soro (1,8  $\mu\text{mol/mL}$ ), com variações entre 1,11  $\mu\text{mol/mL}$  e 3,5  $\mu\text{mol/mL}$ . Os níveis de MDA na saliva não diferiram significativamente dos níveis séricos ( $P=0,1089$ ).

O intervalo de referência estabelecido para o MDA foi de 1,2 a 6,2  $\mu\text{mol/mL}$  para o plasma, de 1,06 a 5,6  $\mu\text{mol/mL}$  para o soro e de 1,1 a 3,5  $\mu\text{mol/mL}$  para a saliva (Tabela 7). As dispersões dos dados do MDA no plasma, soro e saliva estão representadas nas Figuras 31, 32 e 33, respectivamente.

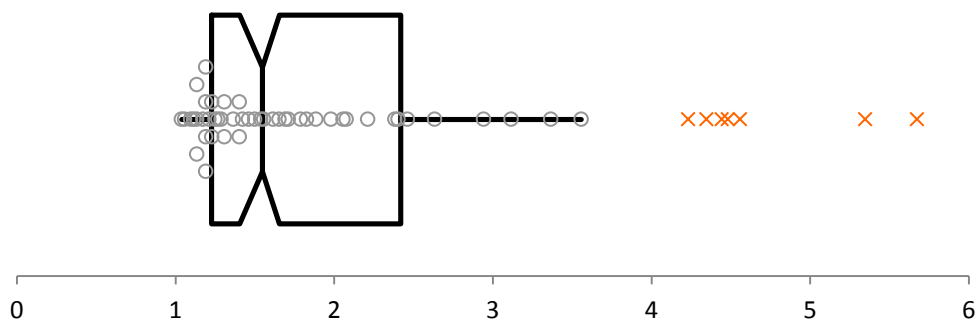
**Tabela 7.** Concentração de malondialdeído em amostras de plasma, soro e saliva de equinos.

Amostra	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo de Referência
Plasma ( $\mu\text{mol/mL}$ )	2,5	1,15	6,2	1,2 a 6,2
Soro ( $\mu\text{mol/mL}$ )	1,5	1,06	5,67	1,0 a 5,6
Saliva ( $\mu\text{mol/mL}$ )	1,8	1,11	3,57	1,1 a 3,5

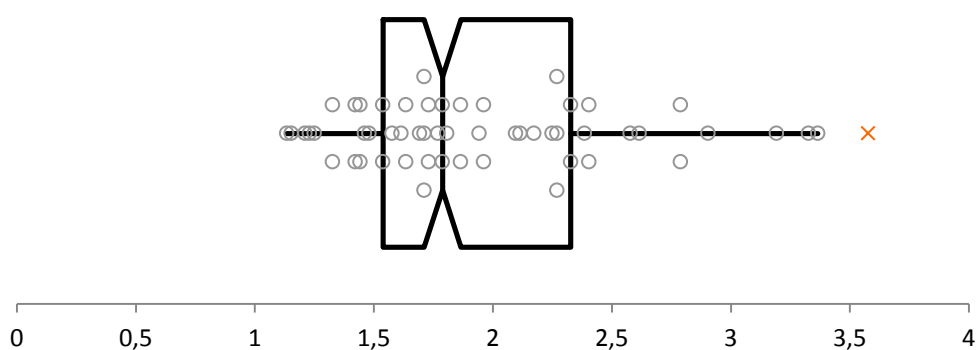
Kruskal Wallis (Valor de  $p=0,1089$ )



**Figura 31.** Dispersão dos níveis de malondialdeído (MDA) em  $\mu\text{mol/mL}$  no plasma de equinos ( $n=55$ ).



**Figura 32.** Dispersão dos níveis de malondialdeído (MDA) em  $\mu\text{mol/mL}$  no soro de equinos,  $n=55$ .



**Figura 33.** Dispersão dos níveis de malondialdeído (MDA)  $\mu\text{mol/mL}$  na saliva de equinos,  $n=55$ .

A correlação entre a concentração do MDA no plasma e saliva e no soro e saliva foi muito forte (Tabela 8). A correlação entre plasma e soro foi positiva muito forte, evidenciando correlação do MDA no sangue colhido com anticoagulante (plasma) e sem anticoagulante (soro).

**Tabela 8.** Valores de correlação e regressão de malondialdeído (MDA) entre amostras de plasma, soro e saliva.

Pareamento	Correlação (r)	Valor-P	Regressão ( $R^2$ )	Valor -P
Plasma x Soro	0,9994	< 0,001	0,881124298	< 0,001
Plasma X Saliva	0,9993	< 0,001	0,982035828	< 0,001
Soro x Saliva	0,9993	< 0,001	0,899007753	< 0,001

Os dados da capacidade antioxidante total não puderam ser usados, pois ficaram fora da curva padrão do teste.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Proteína Total

A concentração média de PT ( $0,9 \pm 0,3$  g/dL) foi menor que no soro ( $6,4 \pm 0,8$  g/dL) com uma correlação entre as variáveis saliva e soro muito baixa.

A diferença de PT entre soro e saliva foi de sete vezes, portanto abaixo do que foi indicado por Nunes et al. (2011) que relataram uma concentração de PT na saliva de equinos de 10 a 15 vezes menor que a do soro.

No presente estudo, a diferença menos significativa entre saliva e soro pode estar relacionada ao estresse a que os animais foram submetidos durante a coleta, visto que a estimulação simpática ( $\alpha$ -adrenérgica) conforme Aps e Martens (2005) reduz o volume e aumenta a concentração de proteína na saliva.

Em equinos, o volume de saliva produzido diariamente pode chegar a 100 litros (LEWIS, 2000), enquanto que em humanos a produção situa-se entre 0,5 a 1,5 litros (JENSEN et al., 2003). Esse volume é justificado pelo hábito alimentar dos equinos que em vida livre se alimentam por cerca de 14 horas por dia (MCGREEVY, 2004) e a mastigação é acompanhada por uma produção abundante de saliva (40-90ml/min) que possibilita a deglutição, umedecendo o alimento com quantidades de minerais e bicarbonato que servem para neutralizar os ácidos formados na porção inicial do estômago (LEWIS, 2000). Desse modo a produção de saliva em equinos é muito maior e em relação à PT mais concentrada.

Quanto à correlação entre saliva e soro, os resultados aqui encontrados são semelhantes aos obtidos por Nunes et al. (2011), sendo evidenciada uma correlação fraca entre soro e fluido oral para PT.

Estudos proteômicos demonstraram que aproximadamente 29% das proteínas plasmáticas são encontradas na saliva humana (DENNY et al., 2008) sugerindo que a maioria das proteínas contidas nos fluidos orais são sintetizadas nas glândulas salivares, o que pode justificar o maior teor de proteínas no soro do equino em relação saliva. Além disso, proteínas plasmáticas abundantes, como a albumina, representam apenas 6% das proteínas salivares (SCARANO et al., 2010).

As imunoglobulinas (Ig), que são moléculas de glicoproteínas produzidas em resposta a um imunógeno e estão incluídas nas PT, são também menos abundantes na saliva que no soro. IgA é o principal isotipo de Ig encontrado em secreções externas, incluindo saliva e lágrimas (WEHMEYER et al., 1991; TAPPUNI; CHALLACOMBE, 1994).

No cavalo, as concentrações de IgA e IgG salivar variam de  $<0,5$  ng/ml a 351  $\mu$ g/ml e de 0,6 a 128  $\mu$ g/ml, respectivamente e quando comparado com outras espécies, a quantidade de IgA na saliva de cavalo, mais baixa que a relatada para a saliva de humanos (PALM et al., 2016). A concentração sérica de IgG varia de 1.000 a 1.500 mg/dL e a de IgA varia de 60 a 350 mg/dL (TIZARD, 2002), o que demonstra uma diminuição muito grande na concentração salivar destas globulinas, contribuindo assim para a concentração de proteína salivar baixa.

Neste estudo a concentração de PT na saliva foi mais alta do que a descrita por Lewis (2000) que encontrou o valor de 0,37 g/dL. Este valor mais alto pode ser justificado pelo estresse no momento da coleta o que contribui para uma maior concentração proteica na saliva.

Estudos conduzidos por Sistig et al. (2002) demonstraram que as subclasses de imunoglobulinas salivares variam em diferentes condições da mucosa bucal e podem ter um papel nas doenças inflamatórias da mucosa bucal e/ou refletir alterações clínicas nessas condições. Desta forma, as concentrações variam de acordo com a saúde bucal.

## 5.2 Malondialdeído (MDA) – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Por meio da avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), obteve-se uma estimativa da concentração de malondialdeído (MDA), um dos mais importantes produtos finais da lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CHIARADIA et al., 1998) nas amostras de saliva e soro.

Os ensaios de TBARS medem diferentes substâncias, incluindo o MDA presente na amostra, e segundo Marlin et al. (2002), em cavalos o MDA representa mais de 90% da concentração de TBARS.

Obteve-se média e mediana de MDA menor na saliva e valores similares no soro e plasma, porém com grande variação individual entre os animais amostrados (diferença maior que 7,5 vezes), corroborando com observações de White et al. (2001) e Mcmeniman e Hintz (1992) sobre uma grande variação dos TBARS em cavalos, incluindo concentrações menores que 2 nmol/L (WHITE et al., 2001) e tão elevadas quanto 7000 nmol/L (MCMENIMAN; HINTZ, 1992). Valores tão divergentes sugerem diferenças metabólicas individuais quanto aos mecanismos oxidativos e capacidade antioxidante.

A concentração de TBARS e conseqüentemente de MDA no plasma pode variar, dentre outros fatores com a atividade física e com a atividade metabólica do indivíduo. Os valores de MDA obtidos (1,06 a 5,67 e 1,15 a 6,2  $\mu\text{mol/mL}$ , para o soro e plasma, respectivamente) foram inferiores aos encontrados por Marlin et al. (2002) em cavalos antes do exercício (66 a 1048 nmol/L), por Avellini et al. (1999) em cavalos não treinados (120 nmol/L) e por Bariani Junior (2015) em cavalos saudáveis sem raça definida ( $62,08 \pm 7,30$  nmol/g), porém próximos dos valores mínimos obtidos por Yonezawa et al. (2010) em equinos da raça Puro Sangue Árabe sem treinamento e em repouso ( $1,07 \pm 0,67$  nmol/mL), e maior que os referenciados por Weigel et al. (2013) em cavalos de polo em repouso (0,15 a 0,89 nmol/L) e por Fernandes et al. (2012) em cavalos da raça American Trotter em repouso (0,56 a 1,06  $\mu\text{mol/L}$ , média de 0,89  $\mu\text{mol/L}$ ).

McMeniman e Hintz (1992) avaliando pôneis submetidos a exercício em esteira e suplementados com vitamina E, observaram uma correlação negativa entre a vitamina E plasmática e os índices de lipoperoxidação, demonstrando a prevenção do estresse oxidativo ocasionado pelo exercício físico por esse composto.

Em cavalos infectados com *Theileria equi* e *Babesia caballi* foi observada uma média de MDA de  $1,58 \pm 0,15$  nmol/mL (DEGER et al., 2009). Os autores sugeriram que estes níveis aumentados de MDA se devem ao aumento na peroxidação lipídica podendo ser um indicador de estresse oxidativo e de lesão eritrocitária causada pela babesiose. Neste contexto, os animais amostrados no presente estudo são provavelmente portadores de *Babesia* sp., visto que Botteon et al. (2002) em um levantamento epidemiológico realizado nos municípios de Seropédica, Itaguaí, Queimados, Nova Iguaçu, Paracambi e Zona Oeste do Município do Rio de Janeiro encontraram uma prevalência de 89,58% para *T. equi* através da técnica de imunofluorescência indireta para cavalos criados sobre regime extensivo. Contudo, nenhum dos animais avaliados apresentava sinais clínicos da babesiose.

A concentração de MDA pode variar também de acordo com a presença de lesões orais como periodontite (GUENTSCH et al., 2008; CANAKCI et al., 2009), sendo a possibilidade da presença de lesões orais não excluída nos animais amostrados no presente estudo.

## 5.3 Ácido Úrico

O ácido úrico, uma substância nitrogenada não proteica derivada da degradação metabólica de ribonucleotídeos purínicos endógenos e de ácidos nucleicos dos alimentos varia

no soro de equinos entre 0,9 e 1,1 mg/dL (KANEKO, 2008), portanto os valores médios de  $0,78 \pm 0,16$  mg/dL obtidos no presente estudo encontram-se ligeiramente abaixo dos limites de referência para a espécie, com valores individuais baixos, normais ou ligeiramente elevados. Os valores deste estudo foram ligeiramente superiores aos encontrados por Abrantes (2013) em cavalos da raça Mangalarga Marchador em repouso, mantidos a pasto (0,54 mg/dL).

Na saliva obteve-se concentrações ligeiramente maiores de ácido úrico que no soro, e em conformidade com resultados de Nunes et al. (2011) houve uma fraca correlação para o ácido úrico no soro e na saliva.

Rehak et al. (2000) referiram-se a valores de ácido úrico na saliva de humanos (0,04 – 0,36 mmol/L) similares aos encontrados no sangue e menores do que os obtidos em equinos no presente estudo. Por outro lado, Aps e Martens (2005) descreveram que as concentrações dos componentes salivares variam em relação ao soro, sendo encontradas concentrações menores de sódio, magnésio e cloreto, maiores de potássio, cálcio, bicarbonato e fosfato e concentrações semelhantes de ácido úrico e ureia, portanto seriam esperados valores mais próximos entre saliva e soro.

De forma semelhante ao lactato, a concentração plasmática do ácido úrico é um bom indicador da intensidade do exercício, pois o ácido úrico provém da degradação de ADP, quando este se acumula na célula por aumento da hidrólise de ATP, para obtenção de energia durante exercícios de alta intensidade (CASTEJÓN et al., 2007), sendo a elevação do ácido úrico uma possível causa de desclassificação, baixa performance e problemas de saúde em cavalos de enduro (ADAMU et al., 2012a).

Segundo Snow et al. (1982), o aumento do ácido úrico após exercícios máximos é menos intenso com o treinamento. Adamu et al. (2012b) observaram em cavalos de enduro eliminados por apresentarem problemas metabólicos no decorrer do percurso concentração de ácido úrico foi de  $78,11 \pm 52,94$   $\mu\text{mol/L}$ , em repouso antes da prova, enquanto que nos animais que concluíram a prova a concentração de ácido úrico foi muito mais baixa ( $7,67 \pm 6,147$   $\mu\text{mol/l}$ ) comprovando a influência deste metabólito no condicionamento físico dos animais. Também Evans et al. (2002) observaram maior concentração de ácido úrico após o exercício em equinos com histórico de baixo desempenho. Corroborando com estes achados Yoo et al. (2007) observaram que em cavalos PSI treinados para a prova de 2.000 metros a concentração de ácido úrico foi maior (0,30 mg/L) que na prova de 1000 metros (0,22 mg/L).

Destaca-se que no presente estudo os animais amostrados não são atletas e não foram submetidos a exercícios físicos intensos. Portanto, os valores de ácido úrico obtidos não podem ser analisados em relação aos referentes a animais submetidos ao exercício. Também a raça é diferente da maioria dos estudos citados acima.

#### **5.4 Aspartato Aminotransferase e Creatino Quinase**

A atividade sérica e salivar das enzimas AST e CK foram analisadas neste estudo visando a possibilidade de utilização da saliva na avaliação metabólica de cavalos durante e após o exercício, condição em que estas enzimas aumentam naturalmente, com a CK apresentando meia vida menor que 24 horas, e a AST de sete a oito dias (SILVA; DIAS; SOTO-BLANCO, 2007). Esta possibilidade não foi confirmada, visto que a correlação da atividade destas enzimas no soro e na saliva foi muito fraca. Esse resultado não pode ser discutido com base na literatura uma vez que não foram localizados artigos referentes a atividade destas enzimas na saliva de equinos.

A AST uma enzima citoplasmática mitocondrial presente no fígado, musculatura esquelética e cardíaca (TENNANT, 1997) varia fisiologicamente no soro de equinos entre 58

e 94 UI/L (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997). No presente estudo o valor obtido no soro está, portanto acima do intervalo de referência estabelecido para a espécie.

Na saliva o valor encontrado foi superior ao do soro e também acima da normalidade para a espécie. Como não se conhece o metabolismo e a taxa de passagem da AST do sangue para a saliva não é possível concluir sobre os valores salivares obtidos. Considera-se principalmente a possibilidade de interferência de outros componentes salivares nos resultados salivares. Estudos mais específicos devem ser realizados em relação a atividade de enzimas na saliva.

Para a enzima CK obteve-se uma atividade sérica acima do limite de 23,4 UI/L estabelecido como fisiológico para a espécie (KANEKO, 2008) enquanto que na saliva a atividade desta enzima foi baixa.

Robinson (2003) reportou valores de CK no soro equinos da raça PSI entre 2 e 147 UI/L e em cavalos trotadores entre 18 e 217 UI/L. Na faixa de referência relatada por estes autores, Franciscato et al. (2006) encontraram valores médios de 159 UI/L para cavalos da raça Crioula em treinamento enquanto Pritchard et al. (2009) descreveram valores oscilando entre 123 e 358 UI/L para equinos sadios e em repouso. Valberg (2008) descreveu para equinos PSI em repouso valores médios de AST de 296 UI/L. Os valores do presente estudo (155 a 838 com média de 491,7 UI/L) foram, portanto elevados em relação aos valores encontrados por diferentes autores, em equinos de diferentes raças e em diferentes condições.

Balarin et al. (2005) e Câmara e Silva et al. (2007) observaram que os valores de referência da AST para equinos, citados na literatura, são muito variados, sendo necessário o estabelecimento de referências locais, especialmente por sofrerem influência direta de fatores ambientais e de manejo, assim como da raça e atividade física.

Valores aumentados de CK no soro são observados quando há lesão muscular em virtude de decúbito, exercício ou transporte prolongado (BAYLY; KLINE, 2007). No caso dos animais aqui amostrados este fato é pouco provável, visto que percorreram uma pequena distância entre o pasto e o local onde foram colhidas as amostras (cerca de 200 metros) e a atividade física realizada foi de intensidade leve (ao passo ou trote).

Estudos conduzidos por Adamu et al. (2012b) indicam que o condicionamento físico dos animais interfere na atividade sérica da CK, tendo os autores observado valores de CK bem acima ( $1417.25 \pm 790.93$  UI/L) dos limites de referência para a espécie em cavalos que foram eliminados na prova de enduro, sendo estes valores elevados identificados nos animais em repouso e antes da prova. Já para os animais que concluíram a prova a atividade de CK foi de  $187.33 \pm 57.68$  UI/L (ADAMU, et al., 2012 b). No presente estudo, a atividade física desenvolvida pelos animais antes da coleta das amostras, foi leve e provavelmente insuficiente para causar danos musculares, mesmo em animais não condicionados. Destaca-se, portanto, a semelhança com os valores obtidos por Adamu et al. (2012b) em cavalos em repouso e com baixa performance em atividade esportiva.

É importante salientar que esta é uma enzima citoplasmática sujeita à rápida liberação na circulação, como resultado de pequenas alterações celulares (DUNCAN et al., 1994; STOCKHAM, 1995). Adicionalmente, como destacado por Frape (1998) o pico de atividade sérica desta enzima é de 6 a 12 horas após a lesão celular, o que também não é condizente com o tempo decorrido entre o transporte e a coleta do sangue no presente estudo.

Em humanos avaliou-se CK-mb na saliva e no plasma como alternativa diagnóstica em casos de infarto agudo do miocárdio, sendo obtida uma correlação muito forte (MIRZAI-DIZGAH et al., 2012) divergindo do resultado obtido para CK no presente estudo.

Quanto aos valores baixos na saliva divergindo da AST que foi maior na saliva que no soro, reitera-se a necessidade de aprofundar os estudos da dinâmica salivar destas enzimas, pois é possível que o pico da atividade no soro e saliva não sejam simultâneos, e sendo

confirmada esta possibilidade a saliva não se apresenta como substância (meio) adequada para avaliação de CK e AST.

## 5.5 Lactato Desidrogenase

Comparando-se os valores de referência para a atividade sérica da enzima LDH em equinos, nota-se que os resultados obtidos neste estudo em amostras de soro (média 934 UI/L) foram superiores aos propostos por Kaneko; Harvey e Bruss (1997) que citaram valores médios de 252 UI/L, bem como ultrapassaram o limite de 412 UI/L proposto por Meyer; Coles e Rich (1997) e por Fernandes (1994). Verifica-se uma maior proximidade com os resultados obtidos por Da Cãs et al. (2000), que relataram valor médio de 631 UI/L para LDH no soro de cavalos da raça Crioula em treinamento.

Pesquisas sobre a atividade da LDH no soro de equinos sugerem que em animais que realizam atividades físicas frequentes esta enzima pode se apresentar aumentada, mesmo no momento basal, e ainda mais elevada após atividade física de diferentes intensidades (SOUZA, 2013).

Sendo uma enzima presente no citoplasma de quase todas as células do organismo, sua presença extracelular está relacionada à necrose celular ou ruptura de tecidos (LIAW et al., 1997). Neste sentido, não foram evidenciadas lesões ou alterações sugestivas de lise celular nos animais do presente estudo, não havendo aparentemente uma justificativa para os valores elevados de LDH no soro destes animais.

A maior concentração desta enzima na saliva justifica-se pelo perfil isoenzimático de LDH, que é diferente na saliva e no plasma. De acordo com Nagler et al. (2001) as isoenzimas de LDH 4 e 5 predominam na saliva enquanto que as isoenzimas 1 e 2 predominam no soro. Em humanos as isoenzimas 4 e 5 na saliva correspondem respectivamente a 9,3 e 7,8 vezes o valor plasmático enquanto a LDH1 e a LDH2 são, respectivamente 3,2 e 1,3 vezes mais concentradas no plasma.

Ainda que os valores salivares e plasmáticos registrados em humanos tenham sido inferiores aos obtidos em equinos no presente estudo, a LDH total na saliva foi 2,4 vezes maior que no soro, consistente com observações de Nagler et al. (2001), onde a LDH total foi 2,8 vezes maior na saliva que no soro.

Não é possível concluir sobre a normalidade dos valores obtidos para a saliva, pois não foram localizados na literatura valores referentes a LHD na saliva de equinos. Contudo, no soro os valores encontrados estão acima da faixa de referência para a espécie (KANEKO, 2008) o que pode ter contribuído para o aumento da enzima na saliva dos animais amostrados.

A LDH na saliva é predominantemente (75%) proveniente do fluido crevicular gengival, das células epiteliais bucais, do refluxo gastrointestinal e da precipitação celular, e em menor proporção origina-se de glândulas salivares maiores e menores (8,2% da glândula parótida e 14,7% das glândulas submandibular e sublingual) (NAGLER et al., 2001). Assim, é possível que a composição da dieta e dos fluidos sejam relevantes para o aporte de LDH na saliva dos equinos, ainda que não significativamente maior que na saliva de humanos.

Há de se destacar ainda que os valores de LDH são influenciados pela sanidade bucal (HAGHGOO et al., 2016; LOKESH; KANNABIRAN; RAO, 2016), sendo a concentração salivar de LDH maior em pacientes com periodontite (HAGHGOO et al. 2016) e com carcinoma oral de células escamosas (LOKESH; KANNA,BIRAN; RAO, 2016). Neste contexto, não é possível excluir afecções orais nos animais amostrados. Ainda que ao exame físico não tenham sido detectadas afecções orais, para um diagnóstico definitivo da saúde bucal é necessário um exame completo e detalhado da cavidade oral no qual os animais precisariam ser sedados, o que não ocorreu no presente estudo.

## 5.6 Lactato

Neste estudo o lactato foi avaliado por método enzimático no soro e saliva. Contudo, os valores obtidos não apresentam distribuição normal e houve uma grande dispersão entre os dados com valores individuais variando entre normal (mínimo 0,5 no soro e 0,1 mmol/L na saliva) e extremamente elevado (máximo 5,1 no soro e 14,8 mmol/L na saliva). Os valores obtidos foram divergentes em relação aos dados descritos para animais em repouso. Na saliva a média do lactato foi maior que no soro (3,9 mmol/L) com correlação muito baixa entre os fluidos testados, o que está de acordo com Lindner et al. (2000) que informou não haver relação entre a concentração de lactato no plasma e na saliva, destacando que o sangue continua a ser o substrato de escolha para diagnóstico de desempenho em equinos.

Os valores médios do lactato no soro foram pouco maiores em relação aos intervalos descritos para equinos em algumas condições de manejo.

No presente estudo os animais eram mantidos a pasto, sem atividade física regular. Foram colhidas amostras apenas de fêmeas, a maioria em fase final de lactação, portanto com baixa demanda metabólica. Neste contexto, a condição fisiológica e de manejo dos animais equivale a equinos em manutenção, sem condicionamento físico, uma condição que difere da maioria dos estudos recentes sobre lactatemia, realizados com equinos atletas.

Os valores de referência para o lactato para equinos da raça Puro Sangue Inglês segundo Robson (2003) são de 2,5 a 15,5 mmol/dl. Art et al. (1990), encontraram uma média de  $0,52 \pm 0,03$  mmol/l para cavalos Sela Belga, em repouso. Braz et al. (2016) encontraram uma média de 1,85 mmol/L de lactato em equinos antes de uma prova de corrida de 300 metros, considerando este valor normal para os animais em estudo. Durante avaliação de equinos durante o treinamento para corrida, a concentração de lactato mensurada variou entre 2,8 e 7,35 mg/dl. Os autores (MULLEN et al., 1979), consideraram normais os valores obtidos.

De forma semelhante ao ácido úrico e às enzimas CK e AST, o lactato no soro é mais elevado em animais sem condicionamento físico ou que apresentam alterações metabólicas durante atividades esportivas (HINCHCLIFF et al., 2002; ADAMU et al., 2012b). Rivero et al. (2012) demonstraram que o condicionamento físico em equinos proporcionou aumento das estruturas relacionadas com a capacidade aeróbia com exercício de baixa a moderada intensidade por longa duração (45 min/dia), com valores de lactato variando de 1,5 a 2,5 mmol/L.

O treinamento promove algumas mudanças que afetam a concentração de lactato. Cavalos bem treinados apresentam concentrações de lactato mais baixas após a realização de exercício submáximo do que cavalos não treinados, sendo um bom indicador de desempenho (ROSE et al., 1983).

Outro fator promovido pelo treinamento que influencia a taxa de lactato sanguíneo é a velocidade de metabolização do mesmo. Estudos em humanos demonstram que a “clearance” de lactato é aumentada pelo treinamento (DONOVAN; BROOKS, 1983; PHILLIPS et al., 1995). A “clearance” aumentada durante e após o exercício tendem a produzir menores concentrações sanguíneas.

Conforme Tennent-Brown (2014) aumentos na concentração de lactato sanguíneo nos cavalos são geralmente o resultado da diminuição da perfusão tecidual. No entanto, existem outros mecanismos para a hiperlactatemia que podem ser importantes em cavalos doentes.

Em estudo realizado Adamu et al. (2012b) com cavalos de enduro foi verificada concentração de lactato de  $8,59 \pm 2,67$  mmol/L em animais que apresentaram problemas metabólicos no decorrer do percurso, sendo eliminados da prova enquanto que em animais que concluíram a prova a concentração de lactato foi de  $1,03 \pm 0,21$  mmol/L. Os valores no presente estudo foram portanto maiores que dos animais que concluíram a prova de enduro e

menores que dos animais que foram eliminados no estudo de Adamu et al. (2012b), que avaliaram animais 20 minutos após o exercício.

Ainda que com ampla dispersão entre animais individuais, os dados são em parte coerentes com os obtidos em outros estudos, pelo menos para alguns animais individualmente (valores mínimos).

Nos equinos, como no homem pode haver grandes variações individuais nas atividades metabólicas, especialmente relacionados ao exercício. Foi sugerido que aumentos fisiológicos da atividade de enzimas musculares e outros metabólitos se devem a alterações na permeabilidade de membranas celulares possivelmente causadas por hipóxia e pode haver hipóxia tecidual mesmo com cargas de trabalho baixas em equinos não condicionados. É possível prever que estes animais apresentem atividades enzimáticas mais altas após exercícios leves, que animais condicionados (AITKEN et al., 1975; HARRIS, 1988). Este fato justificaria em parte os dados aparentemente alterados da atividade sérica das enzimas CK e LDH, bem como do lactato, considerando que para a coleta os animais do presente estudo foram conduzidos do pasto ao galpão, a uma distância de 200 metros, ao trote.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a saliva pode ser empregada em substituição ao plasma ou soro sanguíneo para análise de TBARS como indicadores de estresse oxidativo em equinos Mangalarga Marchador em condições a pasto.

Biomarcadores de atividade muscular podem ser identificados na saliva. Estes biomarcadores não apresentam correlação significativa com valores plasmáticos o que impossibilita a interpretação direta, sendo necessário aprofundar os estudos da dinâmica salivar dos marcadores do metabolismo muscular.

A coleta da saliva não foi simplificada quando comparado à coleta de sangue, esta foi mais prática, mesmo sendo mais invasiva demonstrou-se menos incomoda.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, R.G.P. Validação de um protocolo de treinamento para provas de marcha da Raça Mangalarga Marchador. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.

ADAMU, L.; NORANIZA, M.A.; RASEDEE, A.; BASHIR, A. Metabolic responses in endurance horses during racing in relation to uric acid profile, leucocytes, heart rate and plasma biochemical parameters. **Veterinarni Medicina**, v.57, n.11, p.591-596, 2012B.

ADAMU, L. ADAMU, L.; NORANIZA, M.A.; RASEDEE, A.; BASHIR, A. Effects of speed, heart rate, lactate and uric acid on the performance of Arabian horses during a 120-km endurance race. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 1,p.1-4, 2012A.

AHMADI MOTAMAYEL, F.; DAVOODI, P.; DALBAND, M.; HENDI, S.S. Saliva as a Mirror of the Body Health. **The Dental Journal of Hamamdan University of Medical Sciences**, v. 1, n .2, 2010.

ANDERSON, M.G. The influence of exercise on serum enzyme levels in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v.7, n.3, p.160-165, 1975.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: the physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic science international**, v. 150, n. 2, p. 119-131, 2005.

ARANZALES, J.R.M. Efeitos do óleo de milho e do sucralfato em equinos portadores de úlceras gástricas. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

AVELLINI, L.; CHIARADIA, E.; GAITI, A. Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**,v.123, n.2, p.147-54,1999.

AVELLINI, L.; SILVESTRELLI, M.; GAITI, A. Training-induced modifications in some biochemical defences against free radicals in equine erythrocytes. **Veterinary Research Communications**, v.19, p.179-184, 1995.

BALARIN, M. R. S.; LOPES, R. S.; KOHAYAGAWA, A.; LAPOSY, C. B. e FONTEQUE, J. H. Avaliação da glicemia e da atividade sérica de aspartato aminotransferase, creatinoquinase, gama-glutamiltransferase e lactato desidrogenase em equinos puro sangue inglês (PSI) submetidos a exercícios de diferentes intensidades. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, n.2, p.211-218, 2005.

BARIANI JUNIOR, A. F. Estresse oxidativo em equinos submetidos à obstrução intraluminal do cólon menor. 2015. xi, 54 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/136734>>.

BAYLY, W.; KLINE, K.A. Hematología y bioquímica. In: BOFFI, F.M. *Fisiologia del Ejercicio em Equinos*. 1.ed. Buenos Aires: Inter-Médica, 2007. p.145-151.

BOTTEON, P.T.L.; MASSARD, C.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; LOSS, Z.G.; LINHARES, G. F. C. Seroprevalencia de Babesia equi en tres diferentes sistemas de crianza de equinos: Rio de Janeiro-Brasil. **Parasitología latinoamericana**, v.57, n.3-4, p.141-145, 2002.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

CÂMARA E SILVA, L.A.; DIAS, R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em equinos de diferentes categorias de atividade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 250-252, 2007.

CANAKCI, C.F.; CICEK, Y.; YILDIRIM, A.; SEZER, U.; CANAKCI, V. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. **European Journal of Dentistry**, v.3, n.2, p.100-6, 2009.

CARDOSO, E.M.L., ARREGGER, A.L., TUMILASCI, O.R., et al. Assessment of salivary urea as a less invasive alternative to serum determinations. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**. v.69 n.3 p.330-4, 2009.

CASINI, L.; GREPPI, G. F. Correlation of racing performance with fitness parameters after exercise tests on treadmill and on track in Standardbred racehorses. **Pferdeheilkunde** v.12, p.466-469, 1996.

CASTEJÓN, F.; RUBIO, M.D.; AGÜERA, E.I. *et al.* Respuesta hematológica y plasmática al ejercicio em cinta rodante. In: LÓPEZ, G.E.V. Valoración morfofuncional e la selección de reproductores del Caballo de Pura Raza Española. 1.ed. Córdoba: **Caja Rural**, p.169-196, 2007.

CHIAPPIN, S; ANTONELLI, G; GATTI, R; DE PALO E.F; Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**. v.383, p.30–40,2007.

CHIARADIA E, AVELLINI L, RUECA F, SPATERNA A.; PORCIELLO F.; ANTONIONI MT; GAITI A. Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in race horses.**Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**;v.119, n.4, p.:833–6, 1998.

CHICHARRO, J. L.; LUCIA, A; PÉREZ, M; VAQUERO, A. F.; URENA, R. Saliva composition and exercise. **Sports Medicine**, v.26, p.17-27, 1998.

COTTA, T.; FERREIRA, M. I. C. A lactatemia, a frequência cardíaca e o hematócrito de cavalos durante as provas de Concurso Completo de Equitação (CCE). **Ciência e Prática**; Lavras, v.18, n.2, p.209-215, 1994.

CRUZAT, V.F.; ROGERO, M.M.; BORGES, M.C. TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v.13, n.5, p.336-342, 2007.

DA CAS, E.L.; ROSAURO, A.C.; SILVA, C.A.M.; BRASS, K.E. Concentração sérica das enzimas creatinoquinase, aspartato aminotransferase e desidrogenase láctica em equinos da raça Crioula. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.625-629, 2000.

D'ANGELIS, F. H. F.; FERRAZ, G. C.; BOLELI, I. C.; LACERDA-NETO J. C.; QUEIROZNETO, A. Aerobic training, but not creatine supplementation, alters the gluteus medius muscle **Journal of Animal Science**, v.83, p.579-585, 2005.

DE LA PEÑA, V.A.; DIOS, P.D.; SIERRA, R.T. Relationship between lactate dehydrogenase activity in saliva and oral health status. **Archives of Oral Biology**, v.52, n.10, p.911-915, 2007.

DEATON, C. M.; MARLIN, D. J. Exercise-associated oxidative stress. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 2, n.3, p.278-291, 2003.

DEGER, S.; DEGER, Y.; BICEK, K.; OZDAL, N.; GUL, A. Status of lipid peroxidation, antioxidants, and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.10, p.743-747, 2009.

DENNISS, A.R.; YOUNG, J.A. Modification of salivary duct electrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. **PflügersArchives European Journal of Physiology**.v.376, p.73-80, 1978.

DENNY, P.; HAGEN, F.K.; HARDT, M.; LIAO, L.; YAN, W.; ARELLANNO, M.; BASSILIAN, S. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland saliva collected as the ductal secretions. **Journal of Proteome Research**, v.7, n.5, p.1994-2006, 2008.

DODDS, M.W.J; JOHNSON, D.A.; YEH, C.K. Health benefits of saliva: a review. **Journal of dentistry**, v.33, n.3, p.223-233, 2005.

DRENT, M.; COBBEN, N.A; HENDERSON, R.F; WOUTERS, E.F; VAN DIEIJEN-VISSER, M. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation. **European Respiratory Journal**, v.9, n.8, p.1736-1742, 1996.

FERNANDES, W. R. Avaliação clínica do sistema circulatório. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária**, v.19, p.69-75, 1997.

FERNANDES, W.R; RODRIGUES, J.A.; MICHIMA,L.E.S.; SIQUEIRA, R.F. Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, p.677-680, 2012.

FERRAZ, G.C.; TEIXEIRA-NETO, A.R.; D'ANGELIS, F.H.F.; LACERDA-NETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Long-term creatine supplementation improves the aerobic capacity of horses **Ciência Rural** v.36, n.2, p.514-519, 2006.

FERRAZ, G. C.; D'ANGELIS, F. H. F.; TEIXEIRA-NETO, A. R.; FREITAS, E. V. V.; LACERDA-NETO, J. C.; QUEIROZ-NETO, A. Blood lactate threshold reflects glucose responses in horses submitted to incremental exercise test. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.256-259, 2008.

FERRAZ, G.C.; TEIXEIRA-NETO, A.R.; PEREIRA, M.C.; LINARDI, R.L.; LACERDANETO, J.C.; QUEIROZ-NETO, A. Influência do treinamento aeróbio sobre o cortisol e glicose plasmáticos em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.23-29, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FICICILAR, H.; ZERGEROGLU, A.M; TEKIN, D.; ERSOZ, G. The effects of acute exercise on plasma antioxidant status and platelet response. **Thrombosis Research**, v. 111, n. 4, p. 267-271, 2003.

FRANCISCATO, C.; LOPES, S. T. A.; VEIGA, A. P. M.; MARTINS, D. B.; EMANUELI, M. P.; OLIVEIRA, L. S. S. Atividade sérica das enzimas AST, CK e GGT em cavalos Crioulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 10, p. 1561-1565, 2006.

FRANDSON, R.D.; WILKE, W.L; FAILS, A.D. **Anatomy and physiology of farm animals**. John Wiley & Sons, 2009.

GEFFRÉ, A.; CONCORDET, D; BRAUN, J.P; TRUMEL, C. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2011.

GLADDEN, L. B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. **Journal of Physiology**, v.558, n.1, p.5-30, 2004.

GOLDFARB, A. H. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Canadian Journal of Applied Physiology**; v.24, p.249-66, 1999.

GOMIDE, L.M.W.; MARTINS, C.B.; OROZCO, C.A.G.; SAMPAIO, R.C.L.; BELLI, T.; BALDISSERA, V.; NETO, J.C.L. Concentrações sanguíneas de lactato em equinos durante a prova de fundo do concurso completo de equitação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.509-513, 2006.

GONZALEZ, D.; MARQUINA, R.; RONDÓN, N. Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva. **Research in Sports Medicine**. v.16, p.128-37, 2008.

GRÖSCHL, M.; KÖHLER, H.; TOPF, H.G.; et al. Evaluation of saliva collection devices for the analysis of steroids, peptides and therapeutic drugs. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**. v.47, p.478-86, 2008.

GUENTSCH, A.; PRESHAW, P.M; BREMER-STRECK, S.; KLINGER, G.; GLOCKMANN E.; SIGUSCH, B.W. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. **Clinical oral investigations**, v.12, n.4, p.345, 2008.

HAGHGOO, J.M.; SOHEILIFAR, S.; BIDGOLI, M.; RASTEGARFARD, N.; SAREMI, M.; KAFILZADE, S.. Comparison of Whole Salivary Lactate Dehydrogenase Level in Patients With and Without Periodontal Disease. **Avicenna Journal of Dental Research**, v. 8, n. 4, 2016.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radical in biology and medicine. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1989.

HARGREAVES, B.J.; KRONFELD, D.S.; WALDRON, J.N.; LOPES, M.A.; GAY, L.S.; SAKER, K.E.; COOPER, W.L.; SKLAN, D.J.; HARRIS, P.A. Antioxidant status of horses during two 80-km endurance races. **The Journal of Nutrition**; v.132, n.6, Suppl 2, p.1781–1783, 2002.

HARRIS, P. A.; MAYHEW, I. G. Musculoskeletal disease. In: REED, S. M.; BAYLY, W. M. (eds) **Equine Internal Medicine**, Philadelphia: W. B. Saunders, p. 371-426, 1998.

HENNEKE, D.R., POTTER, G.D., KREIDER, J.L., YEATES, B.F., Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**. v.15, p.371–372, 1983.

HESS, T.M. Creatinofosfoquinase (CK) e Aspartatoaminotransferase (AST) de cavalos competindo em provas de enduro. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, n. 1, p.70-78, 2000.

HINCHCLIFF, K.W. e GEOR, R.J. Integrative physiology of exercise In: HINCHCLIFF, K.W. e GEOR, R.J **Equine Sports Medicine and Surgery**. Editora Saunders, p. 3-8, 2004.

HINCHCLIFF, K.W.; LAUDERDALE, M.A.; DUTSON, J.; GEOR, R.J.; LACOMBE V.A.; TAYLOR L.E. High intensity exercise conditioning increases accumulated oxygen deficit of horses. **Equine Veterinary Journal**, v.34, n.1, p. 9-16, 2002.

HORN, P.S.; PESCE, A.J. Reference intervals. **A user's guide**. 2005.

HORN, P.S.; PESCE, A.J. Reference intervals: an update. **Clinica Chimica Acta**, v.334, n.1, p.5-23, 2003.

HOWIE-ESQUIVEL, J.; WHITE, M. Biomarkers in acute cardiovascular disease. **The Journal of Cardiovascular Nursing**. v.23, n.2, p.124–131. 2008.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The Journal of prosthetic dentistry**, v.85, n.2, p.162-169, 2001.

HYYPPÄ, S. Endocrinal responses in exercising horses. **Livestock Production Science**, v.92, p.113–121, 2005.

JENSEN, S.; PEDERSEN, A.M.; REIBEL, J.; NAUNTOFTE, B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. **Supportive Care in Cancer**, v.11, n.4, p.207-225, 2003.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 4Ed. Academic Press, 932 p. 1997.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Appendixes. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of domestic animals**. 5th ed. London: Academic Press, 1997. p. 885-906.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I.B. The diagnostic applications of saliva - A review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.13, n.2, p.197-212, 2002.

KINNUNEN, S.; HYYPPA, S.; LEHMUSKERO, A. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and exercise-induced oxidative stress in trotters. **European Journal of Applied Physiology**. v.95, n.5–6, p.550–556, 2005.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses **The Veterinary Journal** v.177, p.178–191, 2008.

LARSON, R. A.; *Naturally Occurring Antioxidants*, Lewis Publishers: New York, 1997, p. 7.  
LEE, Y.H; WONG, D.T; Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. **American Journal Dentistry**. v. 22, n. 4, p.241–248, 2009.

LEWIS, Lon D. **Nutrição clínica eqüina: alimentação e cuidados**. Roca, 2000.

LIAW, C.C.; WANG, C.H.; HUANG, J.S.; KIU, M.C.; CHEN, J.S.; CHANG, H.K. Serum lactate dehydrogenase level in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Acta Oncologica**, v.36, n.2, p.159-164, 1997.

LINDNER, A.; MARX, S.; KISSENBECK, S.; MOSEN, H. Saliva collection and relationship between lactate concentration in blood and saliva of exercising horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n.1, p.52-54, 2000.

LINGSTRÖM, Peter; MOYNIHAN, Paula. Nutrition, saliva, and oral health. **Nutrition**, v. 19, n. 6, p. 567, 2003.

LOKESH, K.; KANNABIRAN, J.; RAO, M.D. Salivary Lactate Dehydrogenase (LDH)-A Novel Technique in Oral Cancer Detection and Diagnosis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v.10, n.2, p. ZC34, 2016.

LOPES, R.F.; OSIECKI, R.; RAMA, L.M.P.L. Biochemical Markers During and After an Olympic Triathlon Race. **Journal of Exercise Physiology Online**, v.14, n.4, 2011.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH, N.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. **The Journal of Nutrition**, v.132, n.6, p.1622-1627, 2002.

MASSANO, J.; REGATEIRO, F.S.; JANUÁRIO, G.; FERREIRA, A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.102, n.1, p.67-76, 2006.

McGREEVY, P. Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists. Londres. Saunders, 2004, 357p.

MCMENIMAN, N.P.; HINTZ, H.F. Effect of vitamin E status on lipid peroxidation in exercised horses. **Equine Veterinary Journal**, v.24, n.6, p.482-484, 1992.

MEUCCI, E.; LITTARRU, C.; DELI, G.; LUCIANI, G.; TAZZA, L.; LITTARRU, G.P. Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. **Free Radical Research**, v.29, n.5, p.367-376, 1998.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico**. 2ed. Roca, 308p. 1995.

MEYER, Helmut; HAGEN, Stéfano. **Alimentação de cavalos**. Livraria Varela, 1995.

MILLS, P.C.; SMITH, N.C.; HARRIS, R.C. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. **Research Veterinary Science**; v.62, n.1, p.11-6, 1997.

MIRZAI-DIZGAH, I.; HEJAZI, S.F.; RIAHI, E.; SALEHI, M.M. Saliva-based creatine kinase MB measurement as a potential point-of-care testing for detection of myocardial infarction. **Clinical Oral Investigations**. v.16, n.3, p.775-779, June 2012.

MOORE, S.; CALDER, K.A.; MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. **Free Radical Research**, v.21, n.6, p.417-25, 1994.

MOURA, S.A.B.; MEDEIROS, A.M.C.; COSTA, F.R.H.; MORAES, P.H.; OLIVEIRA FILHO, S.A., Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura, **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.7, n.2, p.187-194, maio/ago. 2007.

NAGLER, R.M.; KLEIN, I.; ZARZHEVSKY, N.; DRIGUES, N.; REZNICK, A.Z. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radical Biology and Medicine**, v.32, n.3, p.268-277, 2002.

NAGLER, R.M.; LISCHINSKY, S.; DIAMOND, E.; KLEIN, I.; REZNICK, A.Z. New insights into salivary lactate dehydrogenase of human subjects. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 137, n. 5, p. 363-369, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Metabolic Regulation In: **Lehninger Principles of Biochemistry**, 5a edição, Editora Freeman and Company, p. 569 – 614, 2008.

NIETO, F.J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M.D.; COMSTOCK, G.W.; CUTLER, R.G. Uric acid and serum antioxidant: a reaction to atherosclerosis? **Atherosclerosis** v.148, p.131–139, 2000.

NOGUEIRA, G. P.; BARNABE, R. C.; BEDRAN-DE-CASTRO, J. C.; MOREIRA, A. F.; FERNANDES, W. R.; MIRANDOLA, R. M. S.; HOWARD, D. L. Serum cortisol, lactate and creatinine concentrations in Thoroughbred fillies of different ages and states of training. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.1, p.54-57, 2002.

NUNES, L.A.S.; BREZIKOFER, R.; MACEDO, D.V. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. **Clinical Biochemistry**, v.44, n.17, p.1440-1444, 2011.

NUNES, L.A.S.; MACEDO, D.V. Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: potential and limitations. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 4, p. 247-255, 2013.

NUNES, L.A.S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O.S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **Biochemia medica**, v.25, n.2, p.177-192, 2015.

OHKUWA, T.; ITOH, H.; YAMAZAKI, Y.; SATO, Y. Salivary and blood lactate after supramaximal exercise in sprinters and long-distance runners. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v.5, n.5, p.285-290, 1995.

OWEN-SMITH, B.; QUINEY, J.; READ, J. Salivary urate in gout, exercise, and diurnal variation. **The Lancet**, v.351, n.9120, p.1932, 1998.

PALM, A.E.; WATTLE, O.; LUNDSTRÖM, T.; WATTRANG, E. Secretory immunoglobulin A and immunoglobulin G in horse saliva. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.180, p.59-65, 2016.

PEETERS, M.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; LEDOUX, D.; VANDENHEEDE, M. Comparison between blood serum and salivary cortisol concentrations in horses using an adrenocorticotrophic hormone challenge. **Equine Veterinary Journal**, v.43, n.4, p.487-493, 2011.

PINK, R.; SIMEK, J.; VONDRAKOVA, J. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.: Saliva as a diagnostic medium. **Journal of Continuing Education Topics & Issues**, v.12, n.1, p.50-51, 2010.

PINKOWSKI, W.; MOHR, E. e KRZYWANEK, H. Selected blood parameters during recovery from strenuous running exertion in trotters. **Journal of Veterinary Medicine**, v.45, n.5, p.279-286, 1998.

PÖSÖ, A. R.; HYYPPÄ, S.; GEOR, R. J. Metabolic responses to exercise and training horses. In: HINCHCLIFF, K. W. e GEOR, R. J **Equine Sports Medicine and Surgery**. Editora Saunders, p. 771-792, 2004.



PRICE, J. S.; JACKSON, B.; EASTEL, R.; GOODSHIP, A. E.; BLUMSOHN, A.; WRIGHT, I.; STONEHAM, S.; LANYON, L. E.; RUSSEL, R. G. G. Age related changes in biochemical markers of bone metabolism in horses **Equine Veterinary Journal**, v.27, n.3, p.201-207, 1995.

PRITCHARD, J. C.; BURN, C.C.; BARR, A. R. S.; WHAY, H. R. Haematological and serum biochemical reference values for apparently healthy working horses in Pakistan. **Research in Veterinary Science**, v.87, p.389-395, 2009.

RAI, B.; KHARB, S.; JAIN, R.; ANAND, S.C. Salivary vitamins E and C in oral cancer. **Redox Report**, v.12, n.3, p.163-164, 2007.

REHAK NN, CECCO SA, CSAKO G. Biochemical composition and electrolyte balance of unstimulated whole human saliva. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine**. v.38, n.4, p.335-343, 2000.

REY, A.I.; SEGURA, J.; ARANDILLA, E.; LÓPEZ-BOTE, C.J. Short-and long-term effect of oral administration of micellized natural vitamin E (D- $\alpha$ -tocopherol) on oxidative status in race horses under intense training. **Journal of Animal Science**, v.91, n.3, p.1277-1284, 2013.

ROBINSON, E. N. **Current therapy in equine medicine**. 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 2003, 960 p.

SANTOS, V. P. Variações hemato-bioquímicas em equínos de salto submetidos a diferentes protocolos de exercício físico. (Mestrado) **Dissertação** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias-UFRGS Porto Alegre, 2006.

SAYEDDA, K.; AHMED, Q. S. Salivary total antioxidant activity as a non invasive biomarker for oxidative stress in asthmatic patients. **National Journal of Integrated Research in Medicine**, v.3, n.1, p.8-12, 2012.

SCARANO, E.; FIORITA, A.; PICCIOTTI, P.M.; PASSALI, G.C.; CALÒ, L.; CABRAS, T.; INZITARI, R.; FANALI, C.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; PALUDETTI, G. Proteomics of saliva: personal experience. **Acta Otorhinolaryngologica Italica**, v.30, n.3, p.125, 2010.

SCHIPPER, R.G.; SILLETTI, E.; VINGERHOEDS, M.H. Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. **Archives of oral biology**, v.52, n.12, p.1114-1135, 2007.

SCHMIDT, A. et al. Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 38, n. 3, p. 179-189, 2010.

SCHNEYER, L. H. Sympathetic control of Na and K transport in perfused submaxillary main duct of rat. **American Journal of Physiology** v.230, p.341-345, 1976.

SILVA, I.A.C.; DIAS, R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Determinação das atividades séricas de creatina quinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase em equinos de diferentes

categorias de atividade. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.250-252, 2007.

SILVEIRA, V.F. Malondialdeído, vitamina E, cortisol, hemograma e enzimas musculares em equinos da raça Árabe submetidos ao exercício em esteira de alta velocidade. 2005. 92p. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

SISTIG, S.; VUCIĆEVIĆ-BORAS, V.; LUKAC, J.; KUSIĆ, Z. Salivary IgA and IgG subclasses in oral mucosal diseases. **Oral Diseases**, v.8, n.6, p.282-286, 2002.

SOFFLER, C. Oxidative Stress. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.23, p.135-157, 2007.

SOLBERG, H. E. Approved Recommendation (1987). **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.25, n.9, p.645-656, 1987.

SOUKUP, M.; BIESIADA, I.; HENDERSON, A.; IDOWU, B.; RODEBACK, D.; RIDPATH, L.; BRIDGES, E.G. NAZAR, A.M.; BRIDGES, K.G. Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v.4, n.1, p.14, 2012.

SOUZA, BRUNO GONÇALVES. Efeitos do exercício físico em esteira ergométrica de alta velocidade e do período de treinamento de equinos de Concurso Completo de Equitação, Tese (Doutorado), Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2013.

STAINSBY, W. N.; BROOKS, G. A. Control of lactic acid metabolism in contracting muscles and during exercise. **Exercise e Sport Sciences Reviews**. v.18, p.29-63, 1990.

TAPPUNI, A.R.; CHALLACOMBE, S.J. A comparison of salivary immunoglobulin A (IgA) and IgA subclass concentrations in predentate and dentate children and adults. **Molecular Oral Microbiology**, v.9, n.3, p.142-145, 1994.

THOMASSIAN, A.; CARVALHO, F.; WATANABE, M. J.; SILVEIRA, V. F.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; NICOLETTI, J. L. M. Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de equinos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.3, p.183-190, 2007.

TIZARD, I. R. Citocinas e sistema imune. **Imunologia Veterinaria: Uma introdução**, 6th ed., IR Tizard (ed.). Roca, Sao Paulo, Brasil, p. 140-153, 2002.

TREIBER, K; CARTER, R; GAY, L; WILLIAMS, C; GEOR, R; Inflammatory and redox status of ponies with a history of pasture-associated laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v.129 p.216-220, 2009.

TURNER, R. James. Mechanisms of fluid secretion by salivary glands. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.694, n.1, p.24-35, 1993.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p.41 – 54, 2003.

VÄIHKÖNEN, L. K.; HYPPÄ, S.; PÖSÖ, A.R. Factors affecting accumulation of lactate in red blood cells **Equine Veterinary Journal Supplement**, v.30, p.443-447, 1999.

VALBERG, S. J. Skeletal Muscle Function In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6<sup>a</sup> edição, San. Diego: Academic Press, 459-484, 2008.

VINING, R.F.; MCGINLEY, R.A.; SYMONS, R.G. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. **Clinical Chemistry**, v.29, n.10, p.1752-1756, 1983.

VOSS, H. F. Saliva as a fluid for measurement of estriol levels. **American journal of obstetrics and gynecology**, v.180, n.1, p.226-231, 1999.

VOTION, D. M.; NAVET, R.; LACOMBE, V. A.; SLUSE, F.; GUSTAVSSON, B. E.; HINCHCLIFF, K. W.; RIVERO, J. L. L.; VALBERG, S. Muscle energetics in exercising horses **Equine and Comparative Exercise Physiology** v.4, p.105-118, 2008.

WEHMEYER, A.; DAS, P.K.; SWAAK, T.; GEBHART, W.; KIJLSTRA, A. Sjögren syndrome: comparative studies in local ocular and serum immunoglobulin concentrations with special reference to secretory IgA. **International ophthalmology**, v.15, n.3, p.147-151, 1991.

WEIGEL, R.A.; LIMA, A.S.; MORGADO, A.A.; NUNES, G.R.; MIRIAM, M.M.; HAGEN, S.F.; FERNANDES, W.R.; SUCUPIRA, M.C.A. Oxidative metabolism and muscle biochemical profile of polo horses supplemented with an ADE vitamin complex. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 58-62, 2013.

WHITE, A.; ESTRADA, M.; WALKER, K.; WISNIA, P.; FILGUEIRA, G.; VALDÉS, F.; ARANEDA, O.; BEHN, C.; MARTÍNEZ, R. Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.128, n.1, p.99-104, 2001.

YONEZAWA, L.A.; MACHADO, L.P.; DA SILVEIRA, V.F.; WATANABE, M.J.; SAITO, M.E.; KITAMURA, S.S.; KOHAYAGAWA, A. Malondialdeído e troponina I cardíaca em equinos da raça Puro Sangue Árabe submetidos ao exercício e à suplementação com vitamina E. **Ciência Rural**, v.40, n.6, 2010.

YOO, I.; LEE, H.; YOON, HONG, S.; H.; LEE, S. Study on Changes in Racehorses' Metabolites and Exercise-related Hormones before and after a Race. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v.20, n.11, p.1677, 2007.

YOUSSEF, H.; GROUSSARD, C.; MACHEFER, G. Comparison of total antioxidant capacity of salivary, capillary and venous samplings: interest of the salivary total antioxidant capacity on triathletes during training season. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, v.48, n.4, p.522, 2008.