

1. INTRODUÇÃO

A medicina veterinária está muito além de apenas o cuidado da saúde animal estando totalmente relacionada com a saúde humana. Tem sido muito voltada aos aspectos populacionais e preventivos e muitas táticas utilizadas para o combate de enfermidades em populações humanas (PFUETZENREITER; ZYLBERSZTAJN; AVILA-PIRES, 2004). A saúde pública veterinária desempenha diversas funções na saúde pública humana que obedecem à vasta comunhão de interesses existentes entre a Medicina Veterinária e a Medicina Humana e oferecem a oportunidade de uma proveitosa interação entre ambas.

A Gastroenterite canina é classificada como uma zoonose e é das casuísticas mais comuns na clínica médica veterinária. Os principais sintomas que os animais apresentam são vômito, diarréia, desidratação, falta de apetite e apatia, mas o que faz se caracterizar como uma gastroenterite é o animal ter vômito e diarréia concomitantemente. E a origem desta pode ocorrer através de varias fontes, sendo estas alérgicas (alimentos, medicamentos, etc.), por injúrias físicas, parasitas intestinais, bacterianas e vírais. Entre essas fontes, desde 1970, a mais comum é a viral em cães com menos de seis meses de idade e estão entre as principais enfermidades da espécie canina que são responsáveis por índices consideráveis de morbidade e de mortalidade em cães de todo o mundo (BAGGINI, 1991; HOSKINS, 1997). A parvovirose juntamente com a coronavirose são as principais causas das gastroenterites e enterites vírais em cães. Estas podem se apresentar sozinhas ou unidas, sendo a infecção dupla favorecida pela superposição dos mecanismos patogênicos de ambos os vírus (APPEL, 1988).

A saliva é um fluido oral que contém uma abundância de moléculas, sendo não-invasiva, de fácil coleta e com o mínimo de desconforto para o animal, com grande potencial para o monitoramento geral da saúde e doença, com enormes valores de prognósticos.

Portanto, o principal objetivo do presente estudo é a análise da presença e quantificação da IgA salivar e sérica de cães acometidos com gastroenterite e compará-la com cães saudáveis e verificar assim, se esta biomolécula pode ser de eleição para o diagnóstico desta doença, além analisar os padrões hematológicos e bioquímicos séricos, confirmado se estes representam como padrões de diagnóstico diferencial para estas doenças.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Medicina Veterinária e Saúde Pública

A prática veterinária tem sido muito voltada aos aspectos populacionais, preventivos e muitas táticas utilizadas para o combate de enfermidades em populações humanas foram contribuições prestadas pela Medicina veterinária (PFUETZENREITER; ZYLBERSZTAJN; AVILA-PIRES, 2004).

As práticas da cura dos animais que se tem conhecimento foram descritas nas antigas civilizações da Suméria, Egito e Grécia, com referências a curandeiros de animais antes da era cristã. Esse tipo de ocupação acompanhou o surgimento da civilização urbana, pois dependiam da habilidade das populações rurais em produzir alimentos em quantidade suficiente para sua subsistência, fazendo uso da força animal. Ao lado do tratamento médico, cirúrgico e obstétrico individual, duas outras táticas eram aplicadas localmente para o controle das enfermidades animais, o emprego da segregação dos animais saudáveis e doentes (quarentena) e sacrifício dos animais doentes (SCHWABE, 1984).

Em 1762 houve a criação da primeira escola de veterinária, pois houve um grande problema econômico, pois uma enfermidade atingiu um grande número de animais na Europa. Com isso houve o estabelecimento de centros de tratamentos veterinário, primeiro ligado a escola, depois como serviço separado (SCHWABE, 1984).

Nos anos 80 do século XIX houve a “revolução microbiológica” como resultado da compreensão das formas de contágio, que forneceu a base para uma nova abordagem para a investigação de doenças na busca e identificação de seus agentes etiológicos, através dos seguintes nomes, Pasteur, Chauveau, Koch e Salmon. Foram iniciados programas de ações governamentais no combate às infecções dos animais de fazenda. Durante essa fase houve grande sucesso no controle de doenças, o que abriu a possibilidade para a criação de animais em produção intensiva. Nessa fase, foi introduzida outra tática para a prevenção e controle de enfermidades que consiste em ações populacionais como o diagnóstico, a imunização e a terapia em escala populacional, além de alguns procedimentos em ecologia aplicada como o controle de vetores (PFUETZENREITER; ZYLBERSZTAJN; AVILA-PIRES, 2004).

O início das atividades da Medicina Veterinária em Saúde Pública ocorreu no século XIX, na indústria da carne. Robert Von Ostertag na Alemanha e Daniel E. Salmon nos Estados Unidos da América deram início ao que se conhece atualmente como proteção dos alimentos (SALUD, O. M. D. L., 1975). O incremento da pesquisa médica comparada no

final do século XIX propiciou uma forte ligação entre a Medicina Veterinária e a Medicina Humana e influenciou o desenvolvimento de uma tradição educacional em algumas escolas de veterinária mais intimamente ligada aos interesses da Medicina Humana que da agricultura (SCHWABE, 1984). Após a Segunda Guerra, se caracterizou pelo trabalho voltado para a população com o uso da epidemiologia no desenvolvimento de programas de controle de zoonoses pelas agências de saúde pública (SCHWABE, 1984). Em 1946, a conferência de estruturação da Organização Mundial de Saúde recomendou a criação de uma seção de saúde veterinária, que foi estabelecida em 1949.

A formação recebida pelo medico veterinário está em harmonia com o conceito de Saúde Pública, que considera todos os fatores que determinam a saúde coletiva, sem limitar-se às necessidades do indivíduo. As atividades da Saúde Pública Veterinária, citadas são: as zoonoses, a higiene dos alimentos e os trabalhos de laboratório, de biologia e as atividades experimentais. O informe assinala que a luta contra as zoonoses se constitui em uma das principais atividades da saúde pública veterinária. (SALUD, O. M. D. L., 1957). Esta desempenha diversas funções que obedecem à vasta comunhão de interesses existentes entre a Medicina Veterinária e a Medicina Humana e oferecem a oportunidade de uma proveitosa interação entre ambas. Como profissão cruzada, a mesma apresenta natureza interdisciplinar, voltando-se simultaneamente para ambas as direções: os seres humanos e os animais (PFUETZENREITER; ZYLBERSZTAJN; AVILA-PIRES, 2004). A produção de proteínas de alto valor biológico para consumo humano em quantidade suficiente é resultado do sucesso da Medicina Veterinária em manter economicamente sob controle as doenças animais.

2.2. Gastroenterite canina

Doenças gastrointestinais compõem grande parte da casuística da clínica médica de pequenos animais, cujos sinais clínicos típicos são evidenciados através de vômitos e diarreias (BURROWS; BATT; SHERDING, 1995). Desde 1970, as enterites virais são consideradas uma das causas mais comuns de diarreia infecciosa em cães com menos de seis meses de idade, estão entre as principais enfermidades da espécie canina e são responsáveis por índices consideráveis de morbidade e de mortalidade em cães de todo o mundo (BAGGINI, 1991; HOSKINS, 1997). Os fatores que fazem com que haja maior predisposição nos animais jovens são muitos: grande número de células em divisão celular, presença de parasitas intestinais e de um incompleto desenvolvimento do sistema imunológico (BRUNNER; SAWANGO, 1985). Alguns estudos epidemiológicos envolvendo a sensibilidade de algumas

raças a infecção pelo parvovírus revelaram uma maior morbidade das raças Rottweiller e Doberman, com quadros clínicos mais graves (GLICKMAN et al., 1985).

Nos últimos 30 anos a parvovirose emergiu como a causa principal de gastroenterite em cães. A infecção tem sido relatada em várias partes do mundo e ela continua como uma séria ameaça à população canina apesar da presença de vacina (CARMICHAEL, 2005). O parvovírus, dentre os vírus de tropismo digestivo, vem sendo o mais importante agente etiológico das afecções digestivas, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade no interior de coletividades, estando à alta frequência relacionada com a grande resistência do vírus no meio externo (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990). Já a coronavirose canina, presente em canis, não conduz a altas taxas de mortalidade, embora esteja mais difundida que a parvovirose. Entretanto, a infecção dupla é favorecida pela superposição dos mecanismos patogênicos de ambos os vírus (APPEL, 1988).

A alergia alimentar, medicamentosa, pela ingestão de qualquer substância ou objeto estranho são causas comuns que também podem gerar a gastroenterite canina. Há casos em que cães ingeriram cogumelos tóxicos, por exemplo, a espécie *Amanita* causam os sinais da gastroenterite e em seguida disfunções hepáticas graves e insuficiência renal (COPE, 2007; PUSCHNER, 2007; MAGDALAN et al., 2010). Os sinais irão depender da quantidade e da quantidade que o animal ingeriu (COPE, 2007).

Os sinais clínicos da infecção são típicos e o diagnóstico clínico da infecção é apoiado por exames sanguíneos nos quais predomina intensa leucopenia. No entanto, existem outros agentes causadores de gastroenterite e que frequentemente induzem erro no diagnóstico e, consequentemente, podem sub ou superestimar a prevalência da parvovirose em relação a outras enfermidades com sinais clínicos semelhantes (STROTMANN et al., 2008).

O diagnóstico precoce e definitivo da etiologia das gastroenterites caninas torna-se essencial para o tratamento e controle da disseminação do agente etiológico, principalmente se o coronavírus estiver envolvido, e para a alocação adequada de cães com outras infecções gastrointestinais (STROTMANN et al., 2008). Na maior parte o diagnóstico é clínico, onde os médicos veterinários observam os sinais clínicos e complementam e fecham o diagnóstico com o resultado hematológico. Além destes podem também incluir o tempo de repleção capilar que se apresentará aumentado. Recentemente foi referido que o aparecimento repentino de diarreia hemorrágica em cães com menos de dois anos de idade, é fortemente indicativo da infecção pela cepa do parvovírus-2 (MCCAW; HOSKINS, 2006). O teste de coagulação podem também estar alterados, no caso de infecção viral podem apresentar aumento de tromboplastina parcialmente ativada e diminuição da atividade da antitrombina III

(MCCAW; HOSKINS, 2006). O dado radiográfico apresenta sinais inespecíficos, como a presença de gás e acumulo de líquido (HALL; GERMAN, 2005).

Existem métodos de diagnóstico que conseguem caracterizar o agente causador. O teste *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) fecal é considerado como tendo uma boa especificidade, embora seja mais sensível nos primeiros 7 a 10 dias, pois é neste período que a excreção viral é maior (HALL; GERMAN, 2005; MCAW; HOSKINS, 2006). Este teste é usado como meio de diagnóstico de primeira linha, uma vez que constitui uma forma eficaz, rápida e não dispendiosa de chegar ao diagnóstico definitivo (SELLON, 2005). Tem como limitações o fato de não diferenciar as cepas patogénicas da cepa vacinal modificada, uma vez que esta pode estar presente nas fezes entre 5 e 12 dias após a vacinação (HALL; GERMAN, 2005; MCCAW; HOSKINS, 2006). Portanto a possibilidade do aparecimento de falsos-positivos deve ser considerada ao realizar o teste dentro deste período. Aumento do título das IgG pode apenas indicar um contato antigo com cepa viral e a análise das IgM pode evidenciar uma infecção recente, no entanto, nenhuma das titulações permite chegar ao diagnóstico definitivo (HALL; GERMAN, 2005; MCCAW; HOSKINS, 2006).

Outros métodos de diagnóstico como os imunocitoquímicos detectam o vírus em cultura de tecidos, ou a microscopia electrónica que permite identificar vírus em fezes ou em tecidos, são raramente utilizados (MCCAW; HOSKINS, 2006). O método de PCR possui uma alta sensibilidade e especificidade, pelo que constitui uma valiosa ajuda na distinção entre estirpes patogénicas e vacinais (MCCAW; HOSKINS, 2006).

2.3. Saliva

A saliva total é uma complexa mistura. É formada através das secreções das três glândulas salivares principais: parótida, submandibular e sublingual. Porém, além destas, há centenas de glândulas menores espalhadas na mucosa oral (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). A contribuição das diferentes glândulas salivares para a produção de saliva total depende do ritmo circadiano e do tipo de estimulação. Recebem inervação do sistema nervoso autônomo. Em geral, a inervação parassimpática via ação colinérgica, provoca vasodilatação, o que aumenta a quantidade e fluidez da saliva contendo baixos níveis de compostos orgânicos e inorgânicos. A inervação simpática via ação adrenérgica provoca vasoconstrição, diminuindo o volume do fluxo salivar; porém com níveis elevados de proteínas e compostos inorgânicos, aumentando a viscosidade da saliva (PROCTOR; CARPENTER, 2007).

2.3.1. Processo de secreção

A produção da saliva é um processo contínuo e reflexo. Depende da quantidade de alimentos ingerido, das condições físicas, do teor de água e da presença ou não de estímulos (mastigação, olfato e visão).

A secreção salivar origina-se nos ácinos das glândulas e são modificadas nos ductos coletores. A composição da saliva modifica-se ao longo dos ductos coletores, sendo os eletrólitos (Na^+ e Cl^-) reabsorvidos pelo epitélio. As fibras nervosas vegetativas parassimpáticas dos nervos facial e glossofaríngeo terminam nas células secretoras dos ácinos das glândulas salivares e estimulam as células através dos receptores colinérgicos. Podem ser estimulados por reflexo com a antevista de uma refeição. As glândulas salivares também podem ser estimuladas por via nervosa simpática ou pelas catecolaminas circulantes. Esta forma tem pouco a ver com a atividade digestiva e está relacionada com a salivação e gotejamento de saliva (baba) em carnívoros, em pré-ataque. Não possuem regulador endócrino (<http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/PáginasdoMestrado/Mestrado/Fisiologia/Pires/Fluidos-Mestrado.pdf>).

2.3.2. Aspectos de desenvolvimento e morfologia das glândulas salivares

Durante a sexta e à sétima semana embrionária, as glândulas começam a formarem-se como brotos ou proliferações compactas do epitélio da boca primitiva. As extremidades em forma de bastão desses brotos crescem e penetram no mesênquima subjacente. O tecido conjuntivo nas glândulas deriva das células da crista neural. Todo o tecido parenquimatoso (secretor) origina-se da proliferação do epitélio oral (MOORE; PERSAUD, 1994).

Todas as glândulas salivares possuem células acinares que são as responsáveis pela produção e secreção salivar. Essas células contêm grânulos de secreção, sendo que nas glândulas serosas, esses grânulos contêm amilase, e nas glândulas mucosas, esses grânulos contêm mucina. Mas há as que produzem secreções mistas. A glândula parótida é uma glândula salivar puramente serosa, enquanto a submandibular e sublingual são mistas, sendo que a primeira é predominantemente serosa e a segunda, predominantemente mucosa (CASTLE; CASTLE, 1998).

A glândula parótida é a primeira a aparecer (início da sexta semana). Formam-se a partir de brotos que surgem do revestimento ectodérmico do estomodeu (boca primitiva), que crescem na direção dos ouvidos e se ramificam para formar sólidos cordões com extremidades arredondadas. Na décima semana, esses cordões desenvolvem uma luz e se transformam em

ductos. As extremidades arredondadas dos cordões diferenciam-se em ácinos. A cápsula e tecido conjuntivo formam-se a partir do mesênquima circundante (MOORE; PERSAUD, 1994). As secreções começam com 18 semanas (SPERBER, 1989).

Em humanos é a maior glândula salivar. Possuem dois ductos, o de Stensen, que se abre para a cavidade oral ao nível do segundo molar superior e o parotídeo localizado entre o arco zigomático e o canto da boca entre o lábio superior e o filtro do tragus (PROCTOR, 2006).

Em caninos é pequena e irregularmente triangular. Sua extremidade dorsal é larga e está dividida em duas partes por um profundo sulco que recebe a base da orelha. A extremidade ventral é pequena e sobrepõe-se à glândula mandibular. Apresenta apenas um ducto, o ducto parotídeo. Pequenas glândulas parótidas acessórias são às vezes encontradas ao longo do percurso do ducto (ELLENPORT, 1975).

As glândulas submandibulares ou apenas mandibulares surgem no fim da sexta semana. Elas se formam a partir de brotos do endoderma do soalho do estomodeu. Processos celulares compactos crescem posterior e lateralmente à língua em formação. Mais tarde, ramificam-se e se diferenciam (MOORE; PERSAUD, 1994). Os ácinos começam formar-se com 12 semanas e a atividade secretora tem início às 16 semanas (SPERBER, 1989). O crescimento das glândulas prossegue após o nascimento com a formação de ácinos mucosos. Lateralmente à língua, forma-se um sulco que se fecha para constituir o ducto submandibular (MOORE; PERSAUD, 1994).

Em humanos a glândula submandibular tem a metade do peso da parótida e está posicionada na base posterior da mandíbula. Libera a secreção salivar no assoalho da boca, próximo ao frênuo da língua, através do ducto de Wharton (PROCTOR, 2006).

Em carnívoros é frequentemente maior do que a glândula parótida. É de contorno arredondado, de cor amarelo-clara e circundada por uma cápsula fibrosa. O ducto mandibular deixa a face profunda da glândula e abre-se na boca na carúncula sublingual, pouco evidente e próximo ao frênuo da língua (ELLENPORT, 1975).

Já as glândulas sublinguais, aparecem na oitava semana, duas semanas depois das outras duas glândulas salivares. Elas se desenvolvem como brotos múltiplos de endoderma epitelial no sulco paralingual, que se ramificam e se canalizam para formar de 10 a 12 ductos que se abrem de forma independente no assoalho da boca (MOORE; PERSAUD, 1994).

Em humanos a glândula sublingual é a menor das glândulas salivares maiores e é drenada por cerca de 10 pequenos ductos, denominados de ductos de Rivinus, os quais desembocam no assoalho da boca (PROCTOR, 2006).

Em carnívoros é de cor rosada e está dividida em duas partes. A parte caudal (glândula sublingual monostomática) que possui um processo rostral pontudo. Seu ducto, denominado ducto sublingual maior, acompanha o ducto mandibular e se abre ao lado do mesmo, ou une-se a ele. A parte rostral (glândula sublingual polistomática) é longa e estreita. Possuem vários pequenos ductos (de 8 a 12), os ductos sublinguais menores, alguns dos quais se abrem diretamente na boca, enquanto os outros se unem ao ducto principal (ELLENPORT, 1975).

A glândula zigomática é encontrada entre os animais domésticos, apenas nos carnívoros (ELLENPORT, 1975). Ela situa-se na parte rostral da fossa pterigopalatina. Ela se relaciona superficialmente com o arco zigomático. Ela tem quatro ou cinco ductos que se abrem próximos ao último dente molar superior; o ducto maior é quase tão grande quanto o ducto parotídeo; os demais são pequenos (ELLENPORT, 1975).

As glândulas menores, diferentemente das glândulas salivares maiores, não possuem um ducto salivar próprio e estão concentradas em várias regiões, nas partes bucal, labial, palatina e lingual. As maioria das glândulas menores recebem somente inervação parassimpática (PROCTOR, 2006).

2.3.3 Funções

Várias funções foram atribuídas à saliva: a saliva é importante para manutenção da saúde dental, da mucosa oral, dos tratos esofagial e gastrointestinal (MANDEL, 1987; HERRERA; LYONS; JOHNSON, 1988; VALDEZ; FOX, 1991), e quaisquer alterações na quantidade ou qualidade da saliva pode alterar o estado de saúde (LENANDER; IHALIN; LAÈHTEENOJA, 2000). Além de outras vantagens sugeridas por Mandel (1987) como a lavagem da cavidade oral (agregação, manutenção do pH, e integridade dos dentes), a proteção (antibacteriana, antifúngica, lubrificação, manutenção da integridade da mucosa oral, ajuda na reparação tecidual oral, manutenção do balanço ecológico oral), a excreção (balanço da hidratação). Prakophol et al. (2000), atribuíram outras funções, como a digestão e a formação de barreira semipermeável bioativa que recobre a superfície oral e regula a composição de sua flora. Ele complementou dizendo que a saliva realiza a função de proteção pela sua atividade microbicida e capacidade de promover a remoção seletiva de microrganismos ou aderência devido a muitos de seus componentes, (incluem amilases, cistatinas, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas ricas em prolina, anidrases carbônica, peroxidases, esterinas, histatinas, lactoferrina, lisozima, sIgA, mucinas e aglutinina).

2.3.4 Componentes Salivar

A saliva é um líquido incolor, insípido, mais ou menos fluido, com um peso específico entre 1001 e 1009 e alcalina (porco: 7,32; cavalo: 7,56 e boi: 8,2 a 8,4). A água corresponde a 99% da matéria total. Os compostos orgânicos representam 70% da matéria seca (proteínas, mucina, compostos orgânicos de baixo peso molecular), o restante 30% são composto pelos os compostos inorgânicos (cloreto, fosfato, bicarbonato de potássio, sódio e cálcio) e os elementos figurados (leucócitos, microorganismos e células epiteliais de descamação) (<http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/PáginasdoMestrado/Mestrado/Fisiologia/Pires/Fluidos-Mestrado.pdf>).

Na saliva da maioria dos animais contém pouca ou nenhuma amilase, mas a dos omnívoros contém a enzima α -amilase salivar, porém a quantidade no cão e no porco contém pequenas quantidades. Algumas aves possuem amilase salivar no papo.

2.3.4.1. IgA

Uma das classes principais de imunoglobulinas (anticorpos), que protegem os seres humanos contra抗原os, tais como toxinas ou vírus é a imunoglobulina A (IgA). A IgA secretora (sIgA) está presente em abundância nas secreções mucosas e seus níveis em fluidos orais servem como um componente-chave da primeira linha de defesa contra os抗原os que causam infecção respiratória superior, doença periodontal, e cárie (GRANGER; GRANGER; GRANGER, 2006).

A imunoglobulina A secretora (sIgA) é a imunoglobulina mais abundante nas salivas tanto humana quanto de animais. Ela inibe a aderência bacteriana, neutraliza vírus e toxinas, e previne a absorção de抗原os na superfície da mucosa. A forma dimérica da IgA (IgA secretora) está ligada a outra proteína denominada peça secretora, que é produzida por células epiteliais. Este componente facilita o transporte e impede a ação proteolítica sobre a IgA (SALVI; HOLGATE, 1999). IgA quando conjugada com outras moléculas sua função antimicrobiana é aumentada. Biesbrock; Reddy; Levine (1991) sugerem que um complexo entre MG2 e sIgA aumenta a remoção microbiana da cavidade oral.

Esta imunoglobulina encontra-se predominantemente em secreções seromucosas como saliva, lágrima, colostro, leite, líquor, além de secreções traqueobrônquicas, intestinais e genitourinárias (RÚPULO; MIRA; JUNIOR, 1998). A IgA é dentre as imunoglobulinas, a mais presente na mucosa do trato respiratório saudável, além de ser importante na defesa intestinal. Promove fagocitose pelos receptores expressos na superfície de eosinófilos, neutrófilos e

monócitos/macrófagos, neutralizam vírus em células epiteliais (SALVI; HOLGATE, 1999). A IgA, também é encontrado no soro. IgA sérica pode funcionar como uma segunda linha de defesa, eliminando patógenos que tenham violado a superfície da mucosa (OTTEN; VAN EGMOND, 2004).

Sabe-se que a superfície da mucosa do trato gastrointestinal está repleta folículos organizados e antígeno-reativas de tecidos linfóides, incluindo as células B, linfócitos T, células de plasma, e outros elementos celulares envolvidos na indução e manutenção da resposta imune. O tecido linfóide associado ao intestino é considerado o principal local indutivo da mucosa para respostas imunes (STAATS et al, 1994). IgA contribui para a exclusão imune por complexação com o antígeno e limitando a sua absorção luminal (DECARO et al, 2004).

A verificação da presença de imunoglobulina A nas secreções externas, tais como saliva, lágrima, colostro e fluidos que se encontram revestindo todas as mucosas dos tratos respiratórios, gastrointérino e urinário, abriu novas perspectivas para o estudo. Portanto, a saliva poderia ser usada como uma fonte alternativa não invasiva e indicadora da resposta fisiológica.

2.3.5. Biotecnologia em diagnóstico pela saliva na medicina humana

O uso do fluido oral como uma ferramenta para avaliação da saúde e diagnóstico para doenças humanas e animais tem uma longa história (PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010).

A habilidade de utilizar a saliva para monitorar a saúde de um paciente é um desafio bastante atraente tanto na Saúde Pública quanto no desenvolvimento tecnológico. No entanto, só recentemente tem se entendido e apreciado o grau em que a saliva pode refletir o espectro de estados de saúde e doença. Tais estados incluem níveis teciduais de substâncias normais e uma grande variedade de moléculas introduzidas no organismo por dependência terapêutica, propósitos recreativos, estados emocionais, hormonais, imunológicos e influências metabólicas e nutricionais.

Pollace e Ceraulo (1909) relataram aglutinação sensível e específica para *Micrococcus melitensis* (*Brucella melitensis*) no fluido oral de pacientes que foram diagnosticados com a Febre de Malta, assim, foi demonstrado indiretamente à presença de anticorpos na saliva. Porém a mudança na importância do uso do fluido oral seguiu depois do trabalho de Archibald et al. (1986), quando demonstraram a detecção do anticorpo contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em fluido oral de pacientes que adquiriram a síndrome da

imunodeficiência (AIDS). Por causa desse trabalho e/ou por causa do avanço tecnológico o uso do fluido oral para ensaios, foram utilizados com sucesso em medicina humana durante alguns anos no passado, testes de diagnóstico, como por exemplo, drogas (HAECKEL; BUCKLITSCH, 1987), imunoglobulinas [Ig] (KUGLER; HESS; HAAKE, 1992), hormônios esteróides e não esteróide (AARDAL-ERIKSSON, KARLBERG, HOLM, 1998a; COSTIGAN, GUYDA, POSNER, 1988; LAC, LAC, ROBERT, 1993) e proteínas de fase aguda [APP] (KEUR, ABRAHAM-INPIJN, NIEW AMERONGEN, 1994; WHITENER, TURNER, PEDERSON, 1994; PEDERSON, STANKE, WHITENER, 1995a; GRIMOUD et al., 1998).

A presença de proteínas do soro em humanos foi demonstrada em 1960 por Ellison; Mashimo; Mandel (1960). Verificaram que os anticorpos só estavam presentes no fluido oral quando estava presente no soro do mesmo paciente, concluindo que esta foi à evidência da transferência seletiva e regular individual de proteínas séricas em saliva. Isto pode ser parcialmente verdadeiro, mas não totalmente responsáveis por todos os anticorpos no fluido oral (PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010).

Em 1964, cinco isotipos de anticorpos (IgM, IgG, IgA, IgD e IgE) foram identificados na amostra salivar em humanos (MARTIN, 1969) e o isotipo mais evidente foi o IgA (TOMASI; ZIGELBAUM, 1963). A identificação de um componente secretor em conjunto com IgA (SOUTH et al, 1966) e IgM (BRANDTZAEG, 1975) fornece a evidência para a produção local de anticorpo (PRICKETT; ZIMMERMAN, 2010).

Outra área de uso da saliva é na detecção dos níveis de biomarcadores para detectar o estresse ao realizar atividade física. Oliveira et al. (2010), analisaram o efeito de um teste de esforço incremental no perfil de proteínas salivares e para determinar se a proteína C alterou-se em resposta a tais estresses, eles também mediram o limiar da alfaamilase salivar (SAA), proteína total salivar, o lactato sanguíneo e investigaram a correlação entre eles. Eles observaram que o lactato sanguíneo, concentração da proteína total na saliva total e SAA foram alteradas devido ao exercício de uma forma diretamente relacionada a carga do exercício e também observaram que a expressão aumentada de polipeptídeo SAA durante o teste de esforço sugere que SAA é a principal proteína responsável pelo aumento na concentração da proteína total na saliva total, portanto, devido à sua relativa simplicidade, o monitoramento desta é um método eficiente para determinar a intensidade do exercício, quando comparado com a atividade do SAA. Bocanegra et al. (2012), investigaram a variação no lactato salivar, SAA e cromogranina A salivar (sCgA) durante um teste incremental em nadadores e sua dinâmica em comparação com a taxa de acúmulo de lactato sanguíneo. Eles

observaram que a concentração do lactato sanguíneo está altamente correlacionada com lactato salivar durante o exercício e que a sCgA tem valor como um marcador da intensidade do exercício em homens bem treinados.

A principal desvantagem na utilização da saliva como um fluído para diagnóstico tem sido a noção que os possíveis analíticos identificados como marcadores estão presentes em quantidades muito inferiores às do sangue e em consequência sua mensuração torna-se difícil. No entanto, os limites inferiores de detecção têm sido satisfatoriamente estabelecidos e atualmente várias substâncias podem ser mensuradas na saliva (LEE, 2009). Exemplo disso é a validade com que tem sido detectado na saliva o HIV (HOLSCHNEIDER; BEREK, 2000), hepatite A, B e C, cocaína e álcool (MANDEL, 1993).

2.3.5.1. Biomarcadores salivares para doenças crônicas

Segundo dados disponibilizados pela OMS, as doenças crônicas são as principais causa de morte e incapacidade no mundo, mas podem ser prevenidas. Neste sentido, o diagnóstico pela saliva está sendo realizado para diversas doenças e certamente terá uma função impactante na prevenção e monitoramento destas doenças, via um biofluído não invasivo (WHO, 2005 e 2009).

Doenças tais como diabetes, obesidade, doenças respiratórias, câncer e doenças cardiovasculares representam um custo social e econômico de grande relevância. Essas características representam um grande desafio para os países e para seus povos neste século 21, exigindo cada vez mais do sistema de saúde e previdenciário. Por isso, avanços nacionais da biotecnologia e bioensaio utilizando a saliva como plataformas possuem perspectivas interessantes.

A expansão das doenças crônicas, especialmente no século passado e neste século, também está associada aos processos vivenciados pela população mundial tais como a industrialização, urbanismo, desenvolvimento econômico e globalização alimentar. Em consequência, ocorreram diversos fatores impactantes na saúde decorrentes das alterações das dietas alimentares, aumento dos hábitos sedentários e crescimento do consumo de tabaco e álcool. Cerca de metade das mortes causadas por doenças crônicas está associada às doenças cardiovasculares (WHO, 2005 e 2009).

Em todo o mundo, estima-se que 177 milhões de pessoas possuem diabetes, sobretudo de tipo 2, sendo que cerca de dois terços deste total vivem em países em desenvolvimento. Também, segundo dado da OMS existe um número considerável da população mundial com

excesso de peso e provavelmente cerca 300 milhões são clinicamente obesos (WHO, 2005 e 2009).

A mudança dos hábitos alimentares e a implantação de um estilo de vida sedentário ocorrem em um ritmo acelerado nos países em vias de desenvolvimento, por comparação com o que aconteceu nos países desenvolvidos. Assim as doenças crônicas ocorrem em um número maior da população, especialmente nas regiões mais pobres, articulando-se de forma muito perigosa com as doenças infecciosas (WHO, 2005 e 2009).

Para reduzir esta taxa de expansão das doenças cônicas, a adoção de medidas públicas, institucionais, empresariais e individuais poderá contribuir de alguma forma, para aliviar esta expansão. A alteração da dieta, a prática do exercício diário, a redução dos níveis de estresse, um peso corporal mantendo um índice de massa corporal entre 18-24 e a eliminação do consumo de cigarro são fatores essenciais. A adoção destas medidas pelos indivíduos poderá ser monitorada por biomarcadores salivares contribuindo assim para redução dos fatores de risco. Doenças cardíacas, coronárias, *diabetes mellitus* tipo II e mesmo o câncer podem ser modificados pela adoção destas medidas comportamentais.

Em diabéticos, os níveis de biomarcadores do estresse oxidativo e produção de peróxido estão aumentados. Enquanto a disponibilidade de óxido nítrico (NO) está diminuída (GOPAUL et al., 1995; NOUROOZ-ZADEH et al., 1995; HONING et al., 1998). O aumento da produção de NO pela célula endotelial investigado *in vitro* está de acordo com dados sobre a melhora da excreção de NO urinário com intervenções no estilo de vida (ROBERTS et al., 2006). A melhora da função endotelial observada em diabéticos com exercício e dieta foi devido ao aumento do NO endotelial, a redução da produção de espécies reativas, as quais estão correlacionadas inversamente com a disfunção endotelial.

2.3.5.2. Biomarcadores salivares para estresse

Estresse é o estado do organismo, o qual, após a atuação de agente de qualquer natureza, responde com uma série de reações não específicas de adaptação, entre as quais está em primeiro plano uma hipertrofia do córtex adrenal com consequente aumento da secreção de seus hormônios (MEDEIROS, 2009). Essas respostas adaptativas auxiliam na estabilidade do meio interno e garantem a sobrevivência do organismo (CHROUSOS; GOLD, 1992).

A todo fator exógeno que provoca um *estresse* é denominado *estressor* (calor, frio, umidade, fome, sede, infecções, esforços corporais, infestações parasitárias, dor, poluição sonora, elevada densidade populacional, isolamento, medo, ansiedade etc.). A interação entre

estímulo (*estressor*) e resposta ao estímulo (*somatório das reações não específicas ao estressor*), manifesta-se na forma de uma síndrome (SÍNDROME DE ADAPTAÇÃO GERAL), com o qual o organismo tenta evitar ou reduzir os efeitos do estressor (MEDEIROS, 2009). Selye (1955) caracterizou a Síndrome de Adaptação Geral em 3 (três) fases, sendo elas fase de reação de alarme, fase de resistência e fase de exaustão.

A excitação fisiológica é um dos componentes da resposta adaptativa ao estresse. Os agentes estressores provocam respostas centrais e periféricas que afetam todos os sistemas do organismo. A resposta ao estresse é mediada por uma rede de estruturas cerebrais que constantemente recebem informação de centros superiores do sistema nervoso central (SNC), periférico e do ambiente (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). Esta rede integradora se comunica com a glândula pituitária e a junção ponto-medular, as quais mediam a resposta do sistema neuroendócrino e o sistema nervoso autônomo (SNA) (MAYER, 2000). Por meio do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e o SNA, o cérebro influencia todas as células do corpo durante a resposta ao estresse (TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

Neurônios do núcleo para-ventricular do hipotálamo assim como neurônios da medula produtores do hormônio liberador de corticotropina (CRH), juntamente com neurônios do lócus coeruleus (LC), são os coordenadores centrais da resposta ao estresse (CHROUSOS; GOLD, 1992). Grupos celulares do LC e outras células noradrenérgicas da medula são conhecidos como o sistema LC/norepinefrina (NE). Este sistema controla a estimulação do sistema nervoso simpático (SNS), induzida pelo estresse, resultando na liberação de NE por meio de uma rede de neurônios (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). A norepinefrina no cérebro funciona como um sinal de alarme que provoca estados pronunciados de excitação e vigilância enquanto diminui as funções vegetativas, como comer e dormir. Os processos induzidos pela NE no cérebro são acompanhados por incrementos nas respostas autonômicas e neuroendócrinas, incluindo a ativação do eixo HPA (HABIB; GOLD; CHROUSOS, 2001).

O mediador químico mais importante da resposta central ao estresse é o CRH (MAYER, 2000). O estresse é um potente ativador da liberação de CRH pelo hipotálamo e outros locais que incluem o córtex cerebral, o tronco encefálico e a medula (HABIB; GOLD; CHROUSOS, 2001). As células cromafins da medula adrenal são inervadas por nervos pré-ganglionares do nervo esplânico. Tais células medulares produzem catecolaminas, as quais circulam no plasma ligado à albumina e induzem a estimulação do SNS. A ativação do SNS provê um mecanismo de resposta rápida que controla a reação do organismo ao estressor (STRATAKIS; CHROUSOS, 1995). Além de ativar o SNS, a liberação de CRH durante o estresse associada à liberação de arginina vasopressina (AVP) resulta em maior secreção de

hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (CHROUSOS; GOLD, 1992). A secreção de ACTH pela glândula pituitária anterior estimula o córtex adrenal para secretar grandes quantidades de glicocorticóides (principalmente cortisol) (HABIB; GOLD; CHROUSOS, 2001). Os glicocorticóides são o produto final da estimulação do eixo HPA. Estes hormônios possuem um papel central na regulação da atividade basal do eixo HPA e participa do controle da homeostasia de todo o organismo (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). A ativação do eixo HPA inibe o crescimento, a reprodução, a função imune e a resposta inflamatória e afeta o metabolismo e a função gastrointestinal (STRATAKIS; CHROUSOS, 1995).

Os glicocorticóides liberados pelo córtex adrenal em resposta ao ACTH exercem uma retroalimentação negativa sobre a glândula pituitária, os neurônios produtores de CRH no hipotálamo e o sistema LC/NE (TSIGOS; CHROUSOS, 2002). A retroalimentação inibitória dos glicocorticóides limita a exposição dos tecidos a estes hormônios, minimizando assim seus efeitos catabólicos, lipogênicos, anti-reprodutivos e imunossupressores.

2.3.6. Biotecnologia de diagnóstico pela saliva na medicina veterinária

A literatura descreve a detecção de anticorpos e patógenos principais no fluido oral de mamíferos domésticos semelhantes aos relatados na pesquisa com seres humanos.

Em Medicina Veterinária, as amostras de saliva foram utilizadas principalmente para a determinação do cortisol um marcador clássico de estresse pela ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) (VINCENT, MICHELL, 1992; GEVERINK; RUIS; EISEN, 1999). Uso de saliva representa um método não invasivo e não estressante e amplamente utilizado em estudos de medição de tensão por estresse nos animais de fazendas (BARNETT; HEMSWORTH, 1990) e cachorros (BEERDA et al., 1996; BEERDA et al., 2000). Amostras de saliva de cães também foram utilizadas para medição de IgGs, para avaliar a competência imunológica (GERMAN; HALL; DAY, 1998), para a detecção de antígeno do vírus da raiva (KASEMPIMOLPORN et al., 2000), para a monitorização de droga (DUNNETT; LITTLEFORD; LEES, 2002) ou para a detecção do DNA de *Bartonella* (DUNCAN; MAGGI; BREITSCHWERDT, 2007).

2.3.6.1. Biomarcadores salivares para estresse nos animais

Segundo Fraser; Ritchie; Fraser (1975) um animal está em estado de estresse quando necessita alterar de maneira extrema sua fisiologia ou comportamento para adaptar-se a aspectos adversos do seu ambiente e manejo. Essa adaptação envolve uma série de respostas

neuroendócrinas, fisiológicas e comportamentais que funcionam para manter o equilíbrio (BARNETT; HENSWORTH, 1990; VON BORREL, 1995). De acordo com Von Borrel (1995) o estresse é um termo geral que implica em uma ameaça à qual o corpo precisa de ajuda.

Huntingford (1984) comenta que uma das aplicações das pesquisas etológicas é identificar e quantificar os sinais de sofrimento dos animais criados e explorados pelo homem e determinar as condições que induzem a esse estado, encontrando meios para reduzir ou remover tal situação.

Os animais frequentemente apresentam inúmeras mudanças fisiológicas quando expostos a uma série de situações nocivas, desde a possibilidade de agressão física até exposições prolongadas a condições adversas (MEDEIROS, 2009). Segundo Huntingford (1984) estas mudanças ocasionam um aumento na atividade autônoma e na produção de hormônios, que são ditas resultantes do estresse. Uma vez que estas respostas fisiológicas apresentam-se em situações onde, potencial ou efetivamente, o animal ou a integridade de suas funções esteja em perigo, é razoável supor que algo o esteja desagradando e poder-se-ia assim, proporcionar uma maneira de detectar o quanto o animal está sofrendo. Contudo, muitas técnicas para detecção destas mudanças são um tanto invasivas, muito caras e impraticáveis dependendo da espécie, do número de animais em questão etc.; além do fato de que tais reações podem significar que as defesas e a própria saúde do animal estão funcionando bem (MEDEIROS, 2009).

Os animais submetidos a condições mais próximas dos limites estabelecidos pelas leis físicas da natureza tendem a serem menos desenvolvidos. Os animais menos estressados pelo meio ambiente são mais adaptados, sendo aqueles que produzem melhor para aquele ambiente específico (MEDEIROS, 2009).

2.3.6.2. Canino

A diversificação dos trabalhos com fluido oral em cães vem aumentando. Inicialmente os trabalhos eram mais voltados para detecção de anticorpos, imunoglobulinas e agentes patogênicos na saliva. Mas nos últimos anos, os trabalhos visam à detecção de fatores, como atividade e/ou quantificação de biomarcadores que estão relacionados com estresse de diversas naturezas ou qual seria o perfil deste no ritmo circadiano. Também há trabalhos que relaciona a adaptabilidade de um cão para desenvolver certa atividade imposta a ele, como por exemplo, os cães-guias para pessoas com deficiência visual (KIKKAWA et al., 2005).

Heddle e Rowley (1975) descreveram imunoglobulinas no fluido oral de caninos e em maior detalhe por German; Hall; Day (1998). Em seu trabalho eles encontraram uma pequena variação na concentração total de imunoglobulinas entre múltiplas amostras de fluidos orais coletadas do mesmo animal ao longo do tempo.

Kinder et al. (1992), detectaram em cães inoculados com *Taenia pisiformis* após 12 semanas, IgG e IgA específicos. Os autores sugeriram que amostras de fluido oral poderia servir como um método alternativo de detecção de infecção helmíntica intestinal e substituir o método tradicional que é a detecção de proglotides ou ovos em amostras fecais.

Kikkawa et al. (2005) determinaram concentração de sIgA em cães que eram escolhidos para desempenhar o trabalho de cão-guia para pessoas com deficiência visual e nos cães que não foram escolhidos, e concluíram que a concentração de sIgA é extremamente útil para estimar a habilidade de um cão ser cão-guia de cegos.

Kasempimolporn et al. (2000), em seu estudo envolvaram o desenvolvimento de um teste simples e barato para o diagnóstico da raiva baseado em aglutinação do látex (LA), utilizando saliva dos cães. Também foi avaliada a sensibilidade e especificidade do teste LA, comparando-a com a gordura convencional em esfregaços cerebrais. Os resultados mostraram que as amostras de saliva poderiam ser usadas como uma alternativa para o uso do cérebro dos cães para testar antígenos do vírus da raiva. E também Kasempimolporn et al. (2011) avaliaram um teste rápido com uma tira imunocromatográfico para a detecção do vírus da raiva em amostras de saliva de cães e o seu desempenho avaliado por comparação com métodos padrões, concluíram que a tira de teste funciona para detecção do vírus da raiva na saliva do cão.

Duncan; Maggi; Breitschwerdt (2007) em seu estudo cujo objetivo foi determinar se o DNA da *Bartonella* pode ser detectado em esfregaços orais recolhidos a partir de cães infectados e confirmaram sua suspeita. Concluíram que pode ser um risco ocupacional do profissional Medico Veterinário e para outros animais que tem contato extensivo com estes cães.

Kanai et al. (2008) tinham como objetivo do estudo determinar se a secreção salivar de cromogranina de cães apresenta um ritmo circadiano. Porém, essa resposta não foi comprovada.

Parra et al. (2005) tinham como objetivo validar o uso da saliva de cães para o uso num ensaio de tempo determinado imunofluorométrico (TR-IFMA) concebido para a análise da Proteína C reativa (PCr) em amostras de soro e de sangue total e também para avaliar se PCR em amostras de saliva poderia ser usado como um método para detectar a inflamação em cães

na prática clínica. Concluíram que a medição da PCr em amostras de saliva por TR-IFMA poderia ser usada como uma técnica alternativa ou complementar para PCr em amostras de soro de cães, mas são necessários estudos adicionais para avaliar os efeitos dos fatores que podem influenciar a composição da saliva e libertação, como ritmos circadianos, exercícios, medicamentos ou doenças.

Bergamasco et al. (2010) investigaram os efeitos de um programa de interação humana em cães do abrigo e determinar o efeito sobre a variabilidade da freqüência cardíaca canina, comportamento e níveis de cortisol salivar, concluíram que as sessões de interação com humanos têm um efeito positivo sobre o comportamento e que poderiam afetar os indicadores fisiológicos de bem-estar animal.

Dreschel e Granger (2009) tinham como objetivo reduzir as diferenças na literatura, descrevendo uma série de exames clínicos, *in vitro* e *in vivo* de métodos de coleta e materiais para a dosagem do cortisol salivar em cães. Eles não viram diferença significante na mensuração em qualquer método de coleta com 20 minutos de intervalo.

Wenger-Riggenbach et al. (2010) tinham como objetivo verificar se a determinação da concentração de cortisol salivar é uma alternativa prática ao cortisol plasmático para diagnosticar o hiper cortisolismo (HC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

A espécie escolhida para o estudo foi à espécie canina e os locais de coletas foram o Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia e uma clínica veterinária do município de Uberlândia. As coletas de sangue para o hemograma foram realizadas no momento da entrada no animal na clínica. As coletas da saliva e do sangue para o soro sempre ocorriam no mesmo momento, no período da tarde e no mesmo dia que o animal dava entrada na clínica ou no máximo no segundo dia de internação.

Os animais foram separados em três grupos: controle com 42 animais; gastroenterite viral (GEV) com 39 animais e gastroenterites originadas por outras causas (geral) (GEG) com 14 animais. O critério para a separação dos animais nos grupos foi clínico, com base na apresentação das sintomatologias e nos resultados de hemograma.

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), nº 028/13.

3.2. Coleta da saliva

A coleta das amostras salivares ocorreu com o uso do algodão na sua forma isolada, sendo fixada com um pinça ou através de swabs e foram acondicionados no tubo de coleta da Salimetrics®. Foram colocados nas laterais da cavidade oral de cada cão, onde os mesmos, devido à presença do swab, começava a movimentar sua mandíbula, como se estivessem comendo-o, assim deixávamos até observarmos que os mesmos estavam umedecidos com a amostra. Logo em seguida foram acondicionados na parte superior do tubo de coleta. Depois foram armazenados em uma caixa de isopor com gelo para serem transportados até o LABIBI para ser realizado o processamento, aliquotação e identificação de cada amostra.



Figura 1 - Tubo coleta Saliva - Salimetrics®

Ao chegar ao laboratório, às amostras foram para centrifugação, onde ficaram por 15 minutos a 2.000g à temperatura de 4°C. A saliva que estava no algodão foi para a parte inferior do tubo de coleta (fig.1). Após isso a amostra foi aliquotada em tubos eppendorfs com a quantidade necessária para cada análise.

As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da análise.

3.3. Coleta do sangue

A coleta das amostras sanguíneas foi através da punção das veias cefálicas, poplítea ou jugular externa, foram acondicionados no tubo de coleta sanguínea da tampa vermelha de 10 mL, que possuem uma substância ativadora de coagulação. O volume de sangue coletado variou de 3 – 5 mL.

Após a coleta, as amostras de sangue foram acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas até o LABIBI para ser realizado o processamento, aliquotação e identificação de cada amostra.

No laboratório, às amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm à temperatura de 4°C por 15 minutos para obtenção do soro. O soro foi aliquotado em tubos eppendorfs com o volume suficiente para cada análise.

As amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento da análise.

3.4. Coleta dos dados hematológicos

Os dados hematológicos foram coletados dos prontuários dos cães. E a análise foi realizada utilizando os valores de referência de Rizzi et al. (2010).

3.5. Dosagem da concentração de proteína total na saliva

A dosagem de proteína total das amostras de saliva foi realizada de acordo com o protocolo de Bradford (1976) adaptado para microplaca.

Para que possamos realizar essa análise, necessitamos de uma microplaca com 96 poços, o reagente Bradford (100 mg de Comassie blue G; 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido orto-fosfórico e 750 mL de água mile Q), água mile Q e BSA 0,1 mg/mL.

Primeiro fez-se a curva padrão, que nos dá os valores mínimos e máximos ideais da análise. Ele nos mostra se o reagente Bradford está bom ou se houve algum erro no procedimento. Para determinar essa curva padrão, devem-se colocar várias concentrações de BSA começando com zero no primeiro poço e no último poço coloca-se 35 µL, sendo o intervalo entre elas de 5 µL. Em seguida acrescenta-se água mile Q, começando no primeiro poço com 100 µL e no último poço com 65 µL, com variação de 5 µL entre poços. Por último, deve coloca-se 200 µL da substância Bradford em cada poço. Fazer em duplicata esse processo. Após colocar todos os reagentes nos poços, deve cobrir a microplaca com papel alumínio ou deixar-la em algum lugar livre de luz e deixar agir por 10 minutos. Completado o tempo, faz-se a leitura da microplaca utilizando o SoftMax Pro 5.2.

Depois de realizada a curva padrão, faz-se a determinação da concentração de proteínas na saliva. Em cada poço da microplaca será adicionado 5µL da saliva bruta, 95µL de água mile Q e 200µL do reagente de Bradford. A reação resulta em uma coloração azul (Fig.2). O ensaio foi realizado em duplicata e a leitura será feita à absorbância em 595nm à temperatura ambiente.

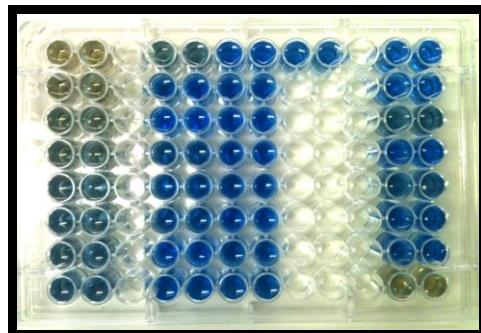


Figura 2 - Proteína total (Bradford)

3.6. Dosagem da concentração de proteína total no soro

A dosagem de proteína total das amostras de soro foi realizada de acordo com o protocolo do kit comercial para proteína total que utiliza o método colorimétrico de biureto.

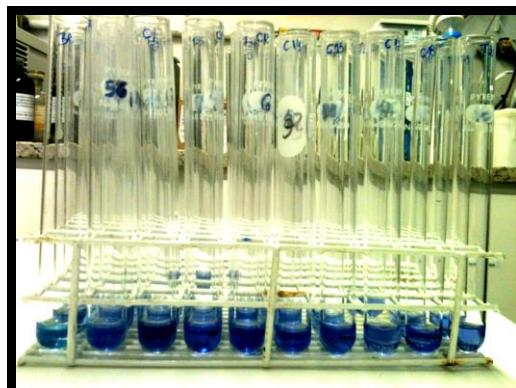


Figura 3 - Proteína sérica total (Biureto)

Para a determinação da concentração, realizamos dois cálculos, primeiro fizemos a determinação do “Fator de Calibração (Fc), onde, $Fc = Cp / Ap$, resultando no valor de 17,3; em segundo o cálculo da concentração das amostras (Ct), onde, $Ct = Fc \times At$. Os valores resultantes como são em g/dL.

3.7. Dosagem da concentração de albumina no soro

A dosagem da albumina das amostras de soro foi realizada de acordo com o protocolo do kit comercial para albumina que utiliza o método colorimétrico de Verde de Bromocresol.

O kit é composto por um “Padrão” que é a proteína albumina bovina na concentração de 4,38 g/dL; o reagente “Verde de Bromocresol” que é composto por um tampão 60 mmol/L e Brij-35 6 mmol/L.

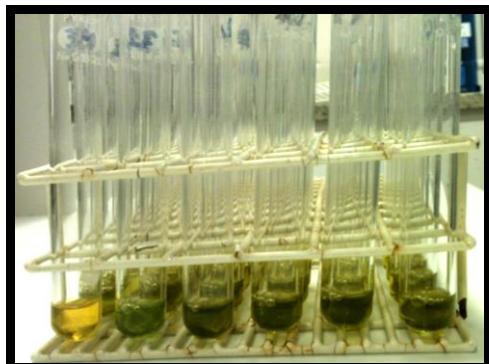


Figura 4 - Albumina pelo método Verde-Bromocresol

Para a determinação da concentração, realizamos dois cálculos, primeiro fizemos a determinação do “Fator de Calibração (Fc), onde, $Fc = Cp / Ap$, resultando no valor de 9,27; em segundo o cálculo da concentração das amostras (Ct), onde, $Ct = Fc \times At$. Os valores resultantes como são em g/dL foram transformados para $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.8. Dosagem da concentração de globulinas no soro

Para determinar a concentração de globulinas não é realizada utilizando-se kit ou qualquer outro método de reação, mas sim, através de um cálculo matemático simples de diferença. Mas para isso, é preciso ter os valores da Proteína total e da albumina.

O cálculo utilizado é: Globulinas = Proteína total – albumina. Os valores resultantes como são em g/dL.

3.9. Eletroforese unidimensional

As amostras de saliva utilizadas nas análises por géis SDS-PAGE foram preparadas adicionando o tampão desnaturante, para que as proteínas presentes nessas amostras saiam da forma terciária ou quartenária e passassem para a forma primária, assim, podendo aparecer como bandas.

O sistema de tampão descontínuo descrito por Laemmili; Favre (1973) foi utilizado, com géis gradiente de acrilamida de 5 a 22% e no empilhamento de 3%. Os géis de separação foram preparados com glicerol 0.7%, tampão de separação 360mM pH 8.8 (Tris-base 45.38%, 6N HCl 10%), SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0.8) nas devidas concentrações, TEMED 0.003% e PSA 0.0128%. O gel de empilhamento preparado com tampão de empilhamento 124 mM pH 6.8 (Tris-base 15.32% e HCl 12N 10%), SDS 0.12%, acrilamida/bisacrilamida (30:1.6) a 3%, TEMED 0.006% e PSA 0.150%.

A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100mM Tris, 7.8 mM EDTA, 770mM glicina, SDS 3% pH 8.3) e corrente constante de 28 mA. Após a corrida, o gel foi corado Coomassie Brilliant Blue R 125 e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%), para a verificação do perfil protéico de cada amostra (Fig.5).

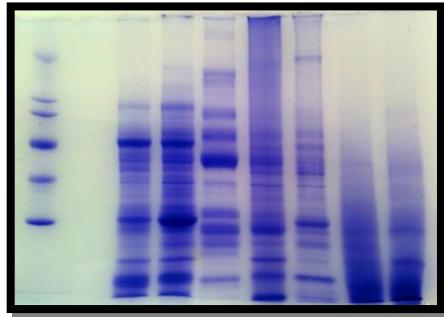


Figura 5 - Gel Eletroforese

3.10. *Western Blotting (WB)*

Para a realização do Western Blotting, as amostras precisaram ser separadas por SDS-PAGE, e o gel ao final da corrida, ao invés de serem colocadas para serem coradas, foram utilizados para o procedimento de “transferência”, onde as proteínas separadas no gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Após esse procedimento, verifica se essa transferência ocorreu de forma correta, corando as membranas com o corante Ponceau (1 g Ponceau S; 50 mL Ácido Acético e 1 L Água mili Q), (Fig.6).



Figura 6 - Membrana Nitrocelulose corada com Ponceau

Depois de verificada a correta transferência da membrana de nitrocelulose, esta foi novamente descorada para que o procedimento possa continuar.

Primeiro a membrana foi bloqueada, para isso utilizou-se leite em pó desnatado, onde o mesmo foi diluído no tampão PBS-T e colocado sobre as membranas, até ser totalmente coberta e ficar por agitação por 4 horas. Após isso, a membrana passou por um processo de 3 lavagens em PBS-T e sondada com anticorpos primários para IgA canino, este permaneceu incubado *overnight*, depois passando novamente pelo processo de lavagem e finalmente

colocou-se o anticorpo secundário (HRP Conjugated Goat anti-Dog IgA Detection Antibody) e foram reveladas pelo método de quimioluminescência *ECL* (Fig.7).

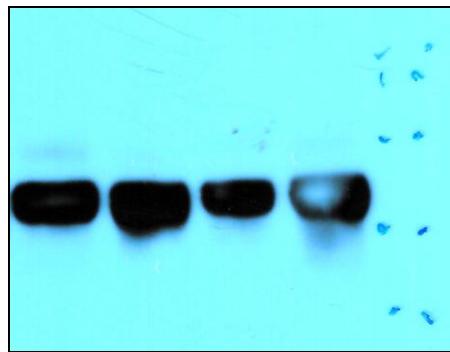


Figura 7 - Western Blotting

As bandas marcadas foram analisadas e quantificadas utilizando o software *Scion Image* obtendo o índice de densidade óptica.

3.11. Determinação da concentração de IgA na saliva e no soro

Para determinar a concentração desta proteína foram utilizadas as técnicas de ELISA e *Western Blotting*, já descrita. As duas técnicas se baseiam na interação anticorpo-antígeno. Na técnica de ELISA foi utilizada uma microplaca de superfície inerte onde em cada poço passou por cinco etapas: a primeira etapa é a de “Revestimento e Bloqueio”. O anticorpo primário anti-IgA canino foi diluído no tampão revestimento (0,05 M de Bicarbonato de Sódio e 0,05 M de Carbonato de Sódio) na proporção de 1:100, ficando incubado por 60 minutos, depois a microplaca passou pelo processo de lavagem e depois foi colocada a solução bloqueio (50 mM de TRIS; 0,14 M de NaCl e 1% de BSA), ficando esta incubada por 30 minutos e novamente passou pelo processo de lavagem; a segunda etapa é a do “Padrão ou/e Amostras”, onde se colocou os padrões já devidamente diluídos (segundo o protocolo do kit comercial) e as amostras de saliva e de soro puros (em duplicata), deixando estes incubados por 60 minutos a temperatura ambiente e após passou pelo processo de lavagem; a terceira etapa é “Detecção do HRP-Anticorpo”, onde o anticorpo secundário foi diluído no diluente conjugado (50 mM de TRIS; 0,14 M de NaCl; 0,05% de Tween 20 e 1% de BSA) na proporção 1:20.000, ficando este incubado por 60 minutos e após passou pelo procedimento de lavagem; a quarta etapa é “Incubação do substrato TMB e Reação Stop”, onde foi adicionado o substrato TMB, a microplaca foi agitada delicadamente e colocada para incubar por 30 minutos em um local livre de luz. A reação resulta em uma coloração azul (Fig.8). Após, adicionou-se a solução Stop (0,18 M H₂SO₄), agitou-se delicadamente a microplaca, onde a cor azul passa para a uma

coloração amarela (Fig.9); a quinta e última etapa é “Mensuração da Absorbância”, com a leitura da microplaca com comprimento de onda de 450 nm utilizando o software SoftMax Pro 5.2.

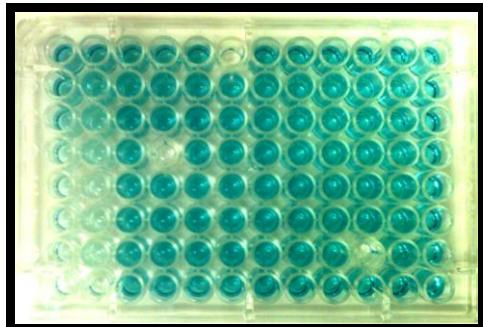


Figura 8 - Microplaca ELISA após incubar o TMB



Figura 9 - Microplaca ELISA após colocar a solução Stop

3.12. Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk antes das análises. Os valores discrepantes foram removidos. Todas as variáveis foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. As relações entre o VGE e GGE foram analisadas usando t-student e comparado com o valor de referência. Para todas as análises o nível de significância foi de $p < 0,05$. Os resultados apresentados são as médias (DS).

4. RESULTADOS

4.1. Hematológicos

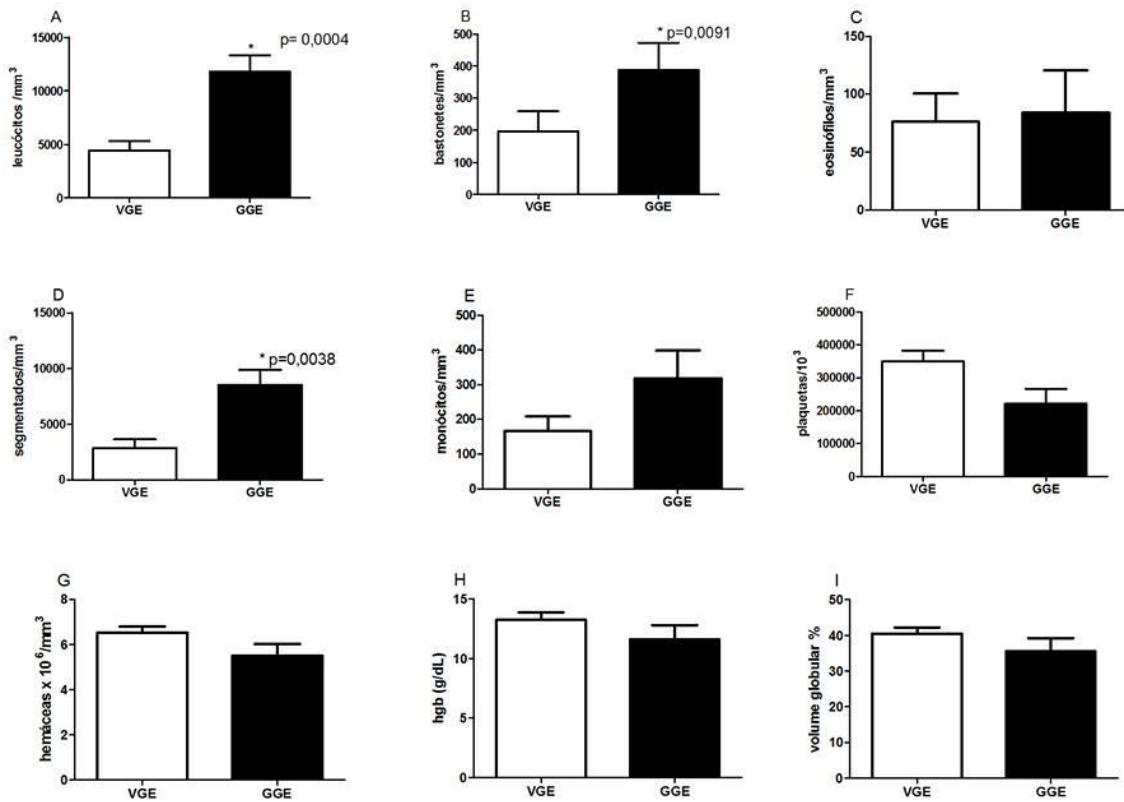


Figura 10 – Comparação entre os valores das médias de cada grupos: leucócitos totais (A), bastonetes (B), eosinófilos (C), neut. segmentados (D), monócitos (E), plaquetas (F), hemáceas (G), HGB (H) e VG (I).
*Diferença entre GEV e GEG (t-student p > 0,05).

A análise dos parâmetros hematológicos mostrou que VGE apresentou leucocitopenia, enquanto o grupo GGE permaneceu dentro valor de referência ($4.434 / \text{mm}^3$, $11.808 / \text{mm}^3$, respectivamente). Do mesmo modo, só GGE mostraram desvio para esquerda ($387 / \text{mm}^3$), além de neutrofilia, enquanto o VGE apresentando uma neutropenia moderada ($2.848 / \text{mm}^3$, $8.529 / \text{mm}^3$, respectivamente). Além disso, apesar de não haver diferença entre os grupos, ambos mostraram eosinopenia (76 e 84 /mm³ para VGE e GGE) e uma monocitopenia ($128,97 / \text{mm}^3$) para GEV. Por outro lado, nenhuma diferença foi observada em grupos para linfócitos e plaquetas (GEV - 1.075 e $210.945 / \text{mm}^3$ GGE - 1.997 e $349.939 / \text{mm}^3$, respectivamente), todos permanecer dentro dos valores de referência. Quando analisou a série

vermelha das células, apenas o volume celular mostrou ligeira microcitose (35,52 %) para GEG.

4.2. Proteínas

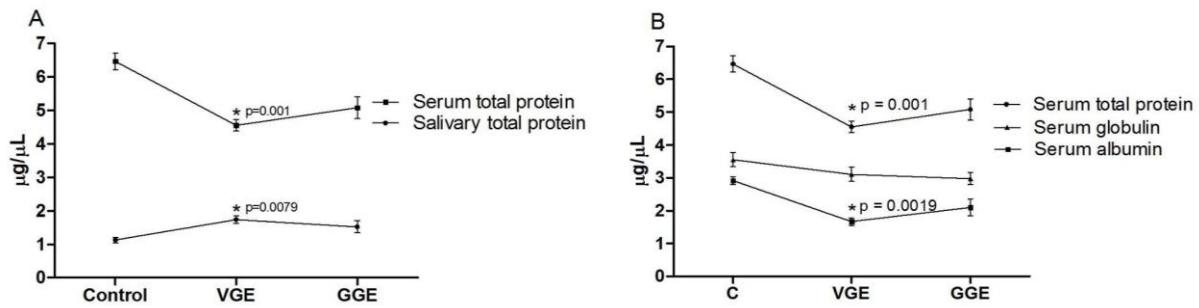


Figure 11 - Comparação entre a proteína total da saliva e soro (A). Relação entre a proteína total, globulina e albumina do soro (B). C - Controle; GEV - Gastroenterite Viral; GEG - Gastroenterite Geral.
* Diferença entre GEV e GEG comparados com o grupo controle. * t-student (A) and ANOVA (B) $p \geq 0.05$ respectivamente.

A figura 02 mostrou uma curva dinâmica oposta no grupo VGE, enquanto houve aumento na proteína total salivar diminuiu a proteína total no soro, em comparação com o controle. Nenhuma diferença foi observada no grupo GGE (figura 02 A). Além disso, uma hipoalbuminemia foi observada no grupo VGE em relação ao controle (Figura 02 B).

4.3. Imunoglobulina A

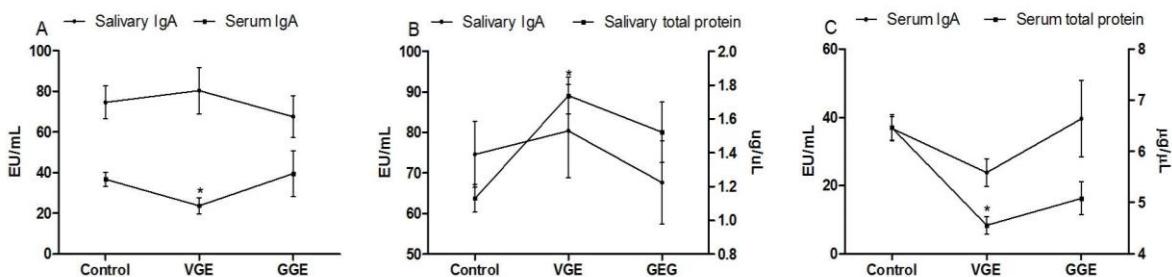


Figure 12 - Comparação entre IgA salivar e sérica (A); IgA e proteína total salivar (B), e de IgA e a proteína total sérica (C). C - Controle; GEV - Gastroenterite Viral; GEG - Gastroenterite Geral.
* Diferença entre GEV e GEG comparados com o grupo controle. * t-student (A) and ANOVA (B) $p \geq 0.05$ respectivamente.

Da análise de IgA como biomarcador para VGE e GGE, os resultados mostraram uma diminuição de IgA sérica apenas no grupo VGE e não houve diferença no outro grupo quando comparado com o controle.

5. DISCUSSÃO

Os achados hematológicos no presente estudo, para a série vermelha, estão de acordo com os resultados encontrados na literatura em cães acometidos com infecção gastrointestinal viral, observando que também nestes estudos os valores permaneciam dentro do padrão de referência (MENDES et al., 2011). Apesar de o parvovírus apresentar um tropismo para as células progenitoras eritróides e outras células do sistema hematopoiético, como neutrófilos e plaquetas, onde estas podem ser igualmente afetadas (RIBEIRO E PROIETTI, 2005) o valor da hemácia no presente estudo não sofreu alteração. No grupo GEG apenas o VG apresentou uma diminuição no seu valor, porém ao comparar com o grupo GEV não apresentou diferença estatística.

Os valores observados para hemácias estão de acordo com os achados para cães com outros tipos de afecções intestinais, como no caso de cães com enterite, nas quais não foram observadas alterações nos valores destes parâmetros (BHAT et al., 2013). A possível explicação para o valor do VG não ter se alterado no grupo GEV pode ser devido ao mecanismo antagônico do VG que baixou quando associado à hemorragia intestinal (BISWAS; CHAKRAVORTY; PRADHAN, 2005).

A leucopenia observada no grupo GEV está correspondente com os dados bibliográficos indicando que os animais acometidos por enterovírus apresentam leucopenia que está associada a um mau prognóstico (WOODS, POLLACK, CARMICHAEL, 1980; POTGIETER et al., 1981; O'SULLIVAN et al., 1984). Cães que foram a óbitos (dado não avaliado no presente estudo) acometidos com a gastroenterite viral (parvovirose), apresentaram discreta leucopenia devido, sobretudo a uma neutropenia severa (FRAZÃO, 2008) já que os neutrófilos seriam a linha celular de maior importância na avaliação do doente (POTGIETER et al., 1981).

Após a avaliação diária de canídeos com parvovirose, pesquisadores concluíram que pode ser estabelecido um prognóstico confiável nas primeiras 24 a 48 horas baseado na contagem total de leucócitos, linfócitos, monócitos e eosinófilos (GODDARD et al., 2008), mesmo período de coleta do presente estudo. Mas há estudos que obtiveram valores leucométricos dentro da normalidade (MENDES et al., 2011) e outros que levaram a afirmar

que a leucopenia não seria o único parâmetro para o estabelecimento do prognóstico (MASON; GILLETT; MUGGENBURG, 1987) e que a neutropenia, mesmo quando severa, não constituía um indicador fidedigno de prognóstico (MCCAW; HARRINGTON; JONES, 1996). Para o grupo GEG não foram observadas alterações na quantidade dos leucócitos totais. Uma provável justificativa é o fato da origem da doença nestes cães não ter sido pela presença viral e sim por causas diversas que não chegaram a interferir nos valores leucocitários totais, reforçando a ideia de que os vírus possuem atividade sobre esta linhagem celular e que este parâmetro pode ser confiável para o diagnóstico da gastroenterite viral.

Como já mencionado, os neutrófilos por serem a linhagem celular com maior representatividade dos leucócitos, tem maior probabilidade de repercutir no valor final dos leucócitos totais. Eles são separados em dois tipos, onde os primeiros são denominados “neutrófilos imaturos, neutrófilo não segmentado ou bastonetes” e o segundo tipo é denominado como “neutrófilos maduros ou neutrófilos segmentados ou apenas segmentados”. O resultado obtido pelo grupo GEV para os neutrófilos em bastonetes está de acordo com o resultado obtido pelo estudo de Mendes et al. (2011), que observaram que a maioria dos cães estudados por eles não apresentou alteração nesta linhagem celular e também com os trabalhos de Frazão (2008) e Goddard et al., (2008). No entanto, o grupo GEG apresentou um desvio para esquerda, o que pode ser justificado por ser a principal linha de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores, especialmente bactérias.

Para os valores dos neutrófilos segmentados, o grupo GEV apresentou uma neutropenia discreta, ficando de acordo com os estudos que demonstraram que cães com enterovírus apresentaram neutropenia, geralmente mais expressiva (FERREIRA et al., 2004; GODDARD et al., 2008). No entanto o grupo GEG apresentou uma neutrofilia, que juntamente a presença do desvio para esquerda, pode ser atribuída à presença de outros patógenos, principalmente bactérias.

Os linfócitos representam outra linhagem leucocitária muito importante na resposta imune humoral dos seres humanos e animais, por ser a segunda maior linhagem leucocitária. O resultado verificado para o grupo GEV está de acordo com os resultados de Mason et al. (1987) e Mendes et al. (2011) que também não verificaram alteração nos valores dos linfócitos. Há pesquisadores que verificaram diferença significativa nos cães que tiveram alta quando comparado com os que foram a óbito que apresentaram uma linfopenia sendo, portanto, importante para o prognóstico da doença (GODDARD et al., 2008; FRAZÃO, 2008). Para o grupo GEG o valor da média também permaneceu dentro da normalidade.

A monocitopenia encontrada para o grupo GEV condiz com os resultados de outros estudos, que verificaram em cães acometidos com gastroenterite canina uma tendência a ter uma monocitopenia (MENDES et al., 2011; GODDARD et al., 2008). Porém, há estudos que esta linhagem celular apresentou-se dentro dos limites do valor de referência (FRAZÃO, 2008; MENDES et al., 2011).

Os dois grupos apresentaram eosinopenia corroborando com a ideia que esta linhagem celular é de importância para o prognóstico da doença, já que foi verificado, eosinopenia para os cães que foram a óbito e valores dentro do valor de referência para os cães que tiveram alta (FRAZÃO, 2008; GODDARD et al., 2008).

As plaquetas possuem o papel importante de manutenção normal da integridade endotelial. Os cães do grupo GEV e GEG apresentaram-se dentro do valor de referência. Alguns cães apresentaram diminuição, porém, nenhum apresentava sinais clínicos de trombocitopenia (FRAZÃO, 2008) e esta ocorrência pode ser explicada pelo fato de ser um achado clínico patológico associado à parvovirose (AXTHELM; KRAKOWKA, 1987).

Os teores de proteínas séricas se comportam como um indicador de hipoproteinemia principalmente em distúrbios gastroentericos graves (JACOBS et al., 1980). Na maioria dos casos de enteropatia com perda de proteínas, os níveis séricos de albumina e globulina estão diminuídos (SILVA et al., 2005). Os cães do grupo GEV apresentaram hipoproteinemia, hipoalbuminemia e as globulinas ficaram dentro da normalidade. Mendes et al. (2011) observaram o mesmo resultado do nosso estudo, exceto para as globulinas, onde os seus valores também apresentaram diminuídos.

O quadro clínico de gastroenterite pode causar inanição e má absorção intestinal, que são sinais (além de outros) que podem resultar na hipoalbuminemia com teores de globulinas normal ou aumentados (LASSEN, 2006). Uma explicação plausível para o resultado do perfil protéico deste estudo é que cães acometidos por gastroenterite viral apresentam perdas protéicas no intestino devido à perda da integridade da mucosa intestinal (MCCANDLISH et al., 1981). O aparecimento da hipoalbuminemia também pode ocorrer quando há o comprometimento da integridade intestinal associada à inapetência (JACOBS et al., 1980). O possível aparecimento do edema decorrente da inflamação epitelial pode ocasionar o rompimento da barreira epitelial intestinal sobre a rede complexa de proteínas que ligam os enterócitos, como por exemplo, as junções de adesão (GROSCHWITZ; HOGAN, 2009).

Os cães do grupo GGE apesar de apresentarem uma hipoproteinemia com hipoalbuminemia, estas não foram significativas, que pode ser explicado pelo provável rompimento da integridade intestinal em decorrência de um edema ou também ser devido à

exposição a alimentos ou substâncias alergênicas, como por exemplo, a intoxicação por cogumelos (HALL; BARTON, 2013). A presença de nematódios em cães também é causadora do declínio da quantidade da albumina e proteína total nos cães infectados (SHAKYA et al., 2013).

Em relação à proteína total na saliva, observou-se diferença estatística apenas no grupo GEV. Este aumento pode ser justificado pelo fato dos cães estarem em estado de desidratação decorrente da diarreia, vômito e também devido à inanição, mal estar e fraqueza, fazendo com que os animais não ingiram água e nem alimentos.

A determinação das concentrações séricas de imunoglobulinas é frequentemente utilizada para avaliar a competência imunológica em cães (GERMAN; HALL; DAY, 1998) e a deficiência de imunoglobulinas totais ou as classes específicas podem estar associadas com infecções secundárias (FELSBURG; GLICKMAN; JEZYK, 1985). Sabe-se que a IgA é a primeira linha de defesa da imunidade das mucosas, justificando o interesse na sua mensuração em cães que estão acometidos com uma doença que afeta a mucosa gastrointestinal e o interesse em realizar esta mensuração na saliva por ser uma amostra biológica de coleta menos invasiva que o sangue. Para maior ênfase e comprovação, foi realizada pelos métodos ELISA e Western Blot, o que é um diferencial, já que a maioria dos estudos realiza apenas a dosagem por ELISA.

A concentração da IgA salivar tem uma ampla faixa de valor em cada cão (GERMAN; HALL; DAY, 1998). Este achado também foi verificado para IgA sérica por Nemi (1993) que encontrou os valores para cães saudáveis entre 70 – 270 mg/dL ou EU/mL. Os valores mínimos e máximos para os animais sadios no presente estudo ficaram abaixo deste valor mencionado, porém o fato da existência de uma ampla faixa de valores também foi verificado, principalmente para os valores nas amostras salivares.

A análise estatística demonstrou que os valores dos grupos GEV e GEG não apresentaram diferença ao comparar com os valores do grupo controle nas amostras salivares, tanto pela análise laboratorial ELISA, quanto no Western Blot (resultado não demonstrado). Na amostra sérica ocorreu diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre o grupo controle e o grupo GEV. Estudos em cães com outras afecções entéricas que quantificaram a IgA em conteúdos fecais, verificaram que apresentava uma diminuição na sua quantidade, porém a sua quantificação sérica permaneceu inalterada (MAEDA, 2013).

A dosagem da IgA sérica em níveis muito baixos (menor que 0,20 mg/mL – 20,0 mg/dL ou 20,0 EU/mL) está relacionada com deficiência seletiva de IgA, doença gastrointestinal crônica, infecções respiratórias e dermatológicas (RINKINEN et al., 2003; MAEDA, 2013).

Uma lesão de larga escala na mucosa intestinal acarreta na deficiência da produção do pIgA, que são os polímeros ou dímeros que constituem o IgA da mucosa. Estes são a principal fonte de IgA sérica dos animais (MESTECKY et al., 1998). Portanto, pelo fato da produção de IgA ser local, a não visualização de diferença estatística para a quantidade de IgA na saliva está de acordo com a doença, já que o local de implantação e atuação dos causadores da doença não é a mucosa oral, não alterando a produção da IgA por suas células.

German; Hall; Day (1998) citam que a falta geral de correlação entre as concentrações relativas de cada classe de imunoglobulina no soro, saliva e lágrimas deve questionar a adequação do uso de concentrações séricas de imunoglobulina para indicar a secreção de imunoglobulina da mucosa no cão. O estudo deles demonstrou um grau de correlação entre a secreção salivar e imunoglobulina ocular, e não com a imunoglobulina do soro. Rinkinen et al. (2003), não visualizaram a correlação entre os níveis de IgA duodenais e da saliva, onde concluíram que o ensaio da IgA salivar é duvidoso para avaliar a IgA da mucosa do intestino. Portanto, isto sugere que a IgA encontrada na superfície da mucosa é originada da síntese local e não oriunda do soro sanguíneo, reforçando a importância da IgA local para a defesa contra invasão de patógenos pela mucosa (MESTECKY, 1993).

A realização de novos estudos com cães acometidos com os diversos tipos de gastroenterite e a quantificação da IgA sérica se faz necessário para confirmar sua importância no diagnóstico.

6. CONCLUSÃO

Com os dados obtidos e pela discussão desenvolvida no presente estudo, concluímos que a quantificação dos componentes da série vermelha do hemograma não se altera e, portanto não apresenta importância no diagnóstico para os tipos da doença estudada.

Para os achados da serie branca do hemograma, nos levaram a concluir que os mesmos possuem valor de diagnóstico. As quantificações dos leucócitos totais juntamente com os dos neutrófilos segmentados, monócitos e os eosinófilos possuem maior relevância e se apresentam na gastroenterite viral com valores diminuídos.

De acordo com o que foi discutido para o perfil proteico sérico dos cães diagnosticados com a gastroenterite canina, permite-se concluir que tanto as dosagens da proteína total, quanto da albumina possuem importância para o diagnóstico, pois são consequências do quadro clínico resultante dos agentes causadores da doença. Quanto aos achados na dosagem

da proteína total salivar, o aumento observado nos animais doentes sugere que o mesmo possa ser utilizado como um parâmetro para o diagnóstico.

No que se refere à quantificação da IgA podemos concluir que não há uma correlação entre os valores da IgA salivar com a IgA sérica e que a dosagem pela saliva não mostrou alterar-se, tanto pelo método ELISA quanto pelo Western Blot. A dosagem de IgA no soro pode ser uma ferramenta adicional no diagnóstico da gastroenterite viral, apresentando uma diminuição na sua quantidade.

A saliva por ser um material biológico de fácil coleta e não invasiva pode ser usada como uma amostra alternativa na clínica veterinária a exemplo do que foi observado neste estudo para a proteína total salivar.

A avaliação da IgA sérica na gastroenterite canina é um parâmetro que auxilia no diagnóstico, e novos estudos devem ser realizados para estabelecer valores de referências.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDAL-ERIKSSON, E.; KARLBERG, B. E.; HOLM, A. C. Salivary cortisol - an alternative to serum cortisol determinations in dynamic function tests. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 36, n. 4, p. 215-222., ISSN 1434-6621. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000074335300003>, Apr 1998a.
- APPEL, M. J. G. Does canine coronavirus augment the effects of a subsequent parvovirus infection? , **Veterinary Medicine**, v. 36, n. 83, p. 6, ISSN 0372-5588, 1988.
- ARCHIBALD, D. W.; ZON, L., GROOPMAN, J. E., MCLANE, M. F., ESSEX, M. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-III (HTLV-III) in saliva of acquired-immunodeficiency-syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for aids. **Blood**, v. 67, n. 3, p. 831-834, ISSN 0006-4971. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1986A373200045>, Mar 1986.
- AXTHELM, M. K.; KRAKOWKA, S. Canine-distemper virus-induced thrombocytopenia **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 8, p. 1269-1275, ISSN 0002-9645. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987J513100019>, Aug 1987.
- BAGGINI, S.P.. Parvovirosis canina. **Veterinaria Argentina**, v. 9, n.81, p.43-46. 1991.
- BARNETT, J. L.; HEMSWORTH, P. H. The validity of physiological and behavioral measures of animal-welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 25, n. 1-2, p. 177-187, ISSN 0168-1591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1990CT12700016>, Jan 1990.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; JANSEN, N. S. C. R. M.; MOL, J. A.. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. **Hormones and Behavior**, v. 30, n. 3, p. 272-279, ISSN 0018-506X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996VN86200010>, Sep 1996.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOF, J. A. R. A. M, et al.. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. **Animal Welfare**, v. 9, n. 1, p. 49-62, ISSN 0962-7286. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000085060600004>, Feb 2000.

BERGAMASCO, L.; OSELLA, M. C.; SAVARINO, P.; LAROSA, G.; OZELLA, L. A.; MANASSERO, M.; BADINO, P.; ODORE, R.; BARBERO, R.; RE, G.. Heart rate variability and saliva cortisol assessment in shelter dog: Human-animal interaction effects. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 125, n. 1-2, p. 56-68, ISSN 0168-1591. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278672800007>, Jun 2010.

BHAT, A. A.; WADHWA, D. R.; SINGH, S. P.; SINGH, I.. **Haematological and biochemical analysis in canine enteritis**. **Veterinary World**. 6: 380 -383 p. 2013.

BIESBROCK, A. R.; REDDY, M. S.; LEVINE, M. J.. Interaction of a salivary mucin-secretory immunoglobulin-A complex with mucosal pathogens. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 10, p. 3492-3497, ISSN 0019-9567. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991GH07600022>, Oct 1991.

BISWAS, S.; CHAKRAVORTY, D.; PRADHAN, N. R. Clinical and haemato-biochemical changes in parvovirus infection in dogs. **Indian Journal of Veterinary Medicine**: 16 - 18 p. 2005.

BOCANEGRA, O. L.; DIAZ, M. M ; TEIXEIRA, R. R.; SOARES, S. S.; ESPINDOLA, F.. Determination of the lactate threshold by means of salivary biomarkers: chromogranin A as novel marker of exercise intensity. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 9, p. 3195-3203, ISSN 1439-6319. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000307538400003>, Sep 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**: 248 - 254 p. 1976.

BRANDTZAEG, P. Human secretory immunoglobulin-M – Immunochemical and immunohistochemical study. **Immunology**, v. 29, n. 3, p. 559-570, ISSN 0019-2805. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1975AP50700018>, 1975.

BRUNNER, C. J.; SWANGO, L. J. Canine parvovirus infection-effects on the immune-system and factors that predispose to severe disease. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 7, n. 12, p. 979-988, ISSN 0193-1903. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AVZ4800002>, 1985.

BURROWS, C. F.; BATT, R. M.; SHERDING, R. G. Diseases of the small intestine. In: SAUNDERS, P. W. (Ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 4º: Ettinger S. J., Feldman E. C., p.1169 – 1232, 1995.

CARMICHAEL, L. E. An annotated historical account of canine parvovirus. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 52, n. 7-8, p. 303-311, ISSN 0931-1793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000232979100003>

>, Sep 2005.

CASTLE, D.; CASTLE, A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 9, n. 1, p. 4-22, ISSN 1045-4411. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000071886700001>, Feb 1998.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders – overview of physical and behavioral homeostasis. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 267, n. 9, p. 1244-1252, ISSN 0098-7484. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HF43900028>, Mar 4 1992.

COPE, R. B. Peer-reviewed - Mushroom poisoning in dogs. **Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 95 - 100, ISSN 8750-7943. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000244643400002>, Feb 2007.

COSTIGAN, D. C.; GUYDA, H. J.; POSNER, B. I. Free insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II in human-saliva. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 66, n. 5, p. 1014-1018, ISSN 0021-972X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1988N110700022>, May 1988.

DE OLIVEIRA, V. N.; BESSA, A.; LAMOUNIER, R. P. M. S.; SANTANA, M. G.; MELLO, M. T.; ESPINDOLA, F. S. Changes in the Salivary Biomarkers Induced by an Effort Test. **International Journal of Sports Medicine**, v. 31, n. 6, p. 377-381, ISSN 0172-4622. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000279057800003>, Jun 2010a.

DECARO, N.; PRATELLI, A.; TINELLI, A.; MARTELLA, V.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, D.; TEMPESTA, M.; CAROLI, A. M.; BUONAVOGLIA, C.. Fecal immunoglobulin A antibodies in dogs infected or vaccinated with canine coronavirus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 102-105, ISSN 1071-412X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000188201400017>, Jan 2004.

DRESCHEL, N. A.; GRANGER, D. A. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 1, p. 163-168, ISSN 0018-506X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000262775500021>, Jan 2009.

DUNCAN, A. W.; MAGGI, R. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Bartonella DNA in dog saliva. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1948-1950, ISSN 1080-6040. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000251446600030>, Dec 2007.

DUNNETT, M.; LITTLEFORD, A.; LEES, P. Phenobarbitone concentrations in the hair, saliva and plasma of eight epileptic dogs. **Veterinary Record**, v. 150, n. 23, p. 718-724, ISSN 0042-4900. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000176392000008>, Jun 8 2002.

ELLENPORT, C. R. Sistema Digestivo. In: (Ed.). **GETTY, R. Sisson/ Grossman. Anatomia dos Animais Domésticos vol.2**: Iowa: W. B. Saunders Company / Trad. Edit. Guanabara Koogan, p.1445 – 1464, 1975.

ELLISON, S. A.; MASHIMO, P. A.; MANDEL, I. D. Immunochemical studies of human saliva. **Journal of Dental Research**. 39: 892 – 898 p. 1960.

FELSBURG, P. J.; GLICKMAN, L. T.; JEZYK, P. F. Selective IgA deficiency in the dog.

Clinical Immunology and Immunopathology, v. 36, n. 3, p. 297-305, ISSN 0090-1229. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985ANC8700005>, 1985.

FERREIRA R. R., BARBOSA P. R., GODINHO E., COSTA U. M., GONZALEZ FELIX H. D., FERREIRO L.. Alterações hemato-bioquímicas em cães jovens com gastrenterite viral: relato de 18 casos. **MEDVEP Revista Científica de Medicina Veterinaria**. 2: 159 - 163 p. 2004.

FRASER, D.; RITCHIE, J. S. D.; FRASER, A. F. The term “stress” in a veterinary context. **British Veterinary Journal**. 131: p. 653 - 662, 1975.

FRAZÃO, P. S. G. Alterações Leucocitárias como factor de prognóstico na evolução clínica da Parvovirose Canina: 191 casos. 107 (**Master thesis in integrated veterinary medicine**). **Technical University Of Lisbon, Faculty of Veterinary Medicine**, 2008.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 107-121, ISSN 0165-2427. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000074462200002>, Jul 8 1998.

GEVERINK, N. A.; RUIS, M. A. W., EISEN, R.. The effect of shot biopsy on behavior, salivary cortisol, and heart rate in slaughter pigs. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 7, p. 1614-1619, ISSN 0021-8812. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084445400002>, Jul 1999.

GLICKMAN, L. T.; DOMANSKI, L. M., PATRONECK, G. J., VISINTAINER, F.. Breed-related risk-factors for canine parvovirus enteritis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187, n. 6, p. 589-594, ISSN 0003-1488. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1985AQW4100005>, 1985.

GODDARD, A.; LEISEWITZ, A. L., DUNCAN, N., CRISTOPHER, M. M.. Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 2, p. 309-316, ISSN 0891-6640. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000254416100011>, Mar-Apr 2008.

GOPAUL, N. K. ; ANGGARD, E. E., MALLET, A. I., BETTERIDGE, D. J., WOLFF, S. P., NOUROOZ-ZADEH, J.. Plasma 8-EPI-PGF(2-ALPHA) levels are elevated in individuals with non-insulin-dependent diabetes-mellitus. **Febs Letters**, v. 368, n. 2, p. 225-229, ISSN 0014-5793. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995RK68400007>, Jul 17 1995.

GRANGER, D. A.; GRANGER, G. A.; GRANGER, S. W. Immunology and developmental psychopathology. In: D., C. e J., C. D. (Ed.). **Developmental psychopathology. Developmental Neuroscience London: Cambridge University Press**, p.677 – 709, 2006.

GRIMOUD, A. M.; ARNAUD, C.; DELLAMONICA, P.; LODTER, J. P.. Salivary defence factor concentrations in relation to oral and general parameters in HIV positive patients. **European Journal of Oral Sciences**, v. 106, n. 6, p. 979-985, ISSN 0909-8836. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000077800000001>, Dec 1998.

GROSCHWITZ, K. R.; HOGAN, S. P. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 124, n. 1, p. 3-20,

ISSN 0091-6749. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267909700001>, Jul 2009.

HABIB, K. E.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology of stress. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 695-728, ISSN 0889-8529. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000171013400010>, Sep 2001.

HAECKEL, R.; BUCKLITSCH, I. The comparability of ethanol concentrations in peripheral-blood and saliva the phenomenon of variation in saliva to blood-concentration ratios. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 199-204, ISSN 0340-076X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1987H501100002>, Apr 1987.

HALL, E. J.; GERMAN, A. J. Diseases of the Small Intestine. In: ETTINGER, S. J. e FELDMAN, E. C. (Ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelpia, U.S.A.: W.B. Saunders Company, v.6th, p.1333 – 1378, 2005.

HALL, J.; BARTON, L. Mushroom toxicosis in dogs in general practice causing gastroenteritis, ptyalism and elevated serum lipase activity. **Journal of Small Animal Practice**, v. 54, n. 5, p. 275-279, ISSN 0022-4510. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000318427200012>, May 2013.

HEDDLE, R. J.; ROWLEY, D. Dog immunoglobulins.1.immunochemical immunochemical characterization of dog serum, paratid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. **Immunology**, v. 29, n. 1, p. 185-195, ISSN 0019-2805. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1975AG60500018>, 1975.

HERRERA, J. L.; LYONS, M. F.; JOHNSON, L. F. Saliva: It's a role in health and disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**. 10: p.569 – 678, 1988.

HOLSCHNEIDER, C. H.; BEREK, J. S. Ovarian cancer: Epidemiology, biology, and prognostic factors. **Seminars in Surgical Oncology**, v. 19, n. 1, p. 3-10, ISSN 8756-0437. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000087957700002>, Jul-Aug 2000.

HONING, M. L. H.; MORRISIN, P. J.; BANGA, J. D.; STROES, E. S.; RABELINK, T. J. Nitric oxide availability in diabetes mellitus. **Diabetes-Metabolism Reviews**, v. 14, n. 3, p. 241-249, ISSN 0742-4221. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000076820300004>, Sep 1998.

HOSKINS, J. D. **Pediatria Veterinária: Cães e Gatos, do nascimento aos seis meses**. Rio de Janeiro: Interlivros: 1997.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162-169, ISSN 0022-3913. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000167512500011>, Feb 2001.

HUNTINGFORD, F. A. **The study of animal behavior**. London: Chapman & Hall: 350 – 356 p. 1984.

JACOBS, R. M.; WEISER M. G., HALL R. L., KOWALSKI J. J.. Clinicopathologic features of canine parvoviral enteritis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 16, n. 6, p. 809-814, ISSN 0587-2871. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1980KX02000001

>, 1980.

KANAI, K.; HINO, M.; HORI, Y., NAKAO, R., HOSHI, F., ITOH, N., HIGUCHI, S. Circadian variations in salivary chromogranin a concentrations during a 24-hour period in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 4, p. 421-423, ISSN 1229-845X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000261653900013>, Dec 2008.

KASEMPIMOLPORN, S.; SAENGSEESOM, W.; LUMLERTDACHA, B.; SITPRIJA, V.. Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 8, p. 3098-3099, ISSN 0095-1137. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000088561700057>, Aug 2000.

KASEMPIMOLPORN, S.; SAENGSEESOM, W.; LUMLERTDACHA, B.; SITPRIJA, V.. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of Rabies virus in dog saliva samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1197-1201, ISSN 1040-6387. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000300143900014>, Nov 2011.

KEUR, I.; ABRAHAMINPIJN, L.; AMERONGEN, A. V. N. Salivary flow-rate and acute-phase proteins in belss-palsy. **Clinical Otolaryngology**, v. 19, n. 5, p. 415-421, ISSN 0307-7772. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1994PQ13100011>, Oct 1994.

KIKKAWA, A.; UCHIDA, Y.; SUWA, Y.; TAGUCHI, K. A novel method for estimating the adaptive ability of guide dogs using salivary sIgA. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 707-712, ISSN 0916-7250. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230951800010>, Jul 2005.

KINDER, A.; CARTER, S.; ALLAN, J.; MARSHALL-CLARKE, S.; CRAING, P. Salivary and serum antibodies in experimental canine taeniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 321-327, ISSN 0304-4017. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992HN31300013>, Mar 1992.

KUGLER, J.; HESS, M.; HAAKE, D. Secretion of salivary immunoglobulin-A in relation to age, saliva flow, mood states, secretion of albumin, cortisol, and catecholamines in saliva. **Journal of Clinical Immunology**, v. 12, n. 1, p. 45-49, ISSN 0271-9142. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1992GZ44500007>, Jan 1992.

LAC, G.; LAC, N.; ROBERT, A. Steroid assays in saliva – a method to detect plasmatic contaminations. **Archives Internationales De Physiologie De Biochimie Et De Biophysique**, v. 101, n. 5, p. 257-262, ISSN 0003-9799. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1993MM80200004>, Sep-Oct 1993.

LAEMMILI, U. K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. **Journal Of Molecular Biology**. 80: p.575 - 579, 1973.

LASSEN, E. D. Avaliação Laboratorial das Proteínas do Plasma e do Soro Sanguíneo. In: THRALL, M. A. (Ed.). **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, cap. 26, p.376 – 390, 2006.

LEE, Y.-H.; WONG, D. T. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. **American Journal of Dentistry**, v. 22, n. 4, p. 241-248, ISSN 0894-8275. Disponível em: <

<Go to ISI>://WOS:000270400100010 >, Aug 2009.

LENANDER-LUMIKARI, M.; IHALIN, R.; LAHTEENOJA, H. Changes in whole saliva in patients with coeliac disease. **Archives of Oral Biology**, v. 45, n. 5, p. 347-354, ISSN 0003-9969. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086457500001 >, May 2000.

MAEDA, S.; OHNO, K.; UCHIDA, K.; NAKASHIMA, K.; FUKUSHIMA, K.; TSUKAMOTO, A.; NAKAJIMA, M.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. Decreased Immunoglobulin A Concentrations in Feces, Duodenum, and Peripheral Blood Mononuclear Cells of Dogs with Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 47-55, ISSN 0891-6640. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000313716200007 >, Jan-Feb 2013.

MAGDALAN, J.; OSTROWSKA, A.; PIOTROWSKA, A.; IZYKOWSKA, I.; NOWAK, M.; GOMULKIWICZ, A.; PODHORSKA-OKOLÓW, M.; SZELAG, A.; DZIEGIEL, P. alpha-Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 48, n. 1, p. 58-62, ISSN 0239-8508. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000282022700008 >, 2010.

MANDEL, I. D. The functions of saliva. **Journal of Dental Research**, v. 66, p. 623-627, ISSN 0022-0345. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987H003200003 >, Feb 1987.

MANDEL, I.D. Salivary diagnosis: More than a lick and a promise. **Journal of the American Dental Association**, v. 124, n. 1, p. 85-87, ISSN 0002-8177. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993KF87600015 >, Jan 1993.

MARTIN, N. The immunoglobulins: a review. **Journal of Clinical Pathology**: 117 – 131 p. 1969.

MASON, M. J.; GILLETT, N. A.; MUGGENBURG, B. A. Clinical, pathological, and epidemiologic aspects of canine parvoviral enteritis in an unvaccinated closed beagle colony - 1978-1985. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 23, n. 2, p. 183-192, ISSN 0587-2871. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1987G425400007 >, Mar-Apr 1987.

MAYER, E. A. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, n. 6, p. 861-869, ISSN 0017-5749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000165504200022 >, Dec 2000.

MCCANDLISH, I. A. P., THOMPSON, H., FISHER, E. W.. Canine parvovirus infection. **In Practice**. 3: p. 5-14, 1981.

MCCAWEY, D. L.; HARRINGTON, D. P. A retrospective study of canine parvovirus gastroenteritis: 89 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. 10: p.157, 1996.

MCCAWEY, D. L.; HOSKINS, J. D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE , C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia, PA, U.S.A.: Saunders Elsevier, p.63 – 70, 2006.

MEDEIROS, L. F. D. **Bem-estar e Produção Animal**. 1 - 28, Universidade Federal do Rio

de Janeiro – Instituto de Zootecnia – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Seropédica - RJ, 2009.

MENDES, R. S.; SOUZA, A. P.; SILVA, R. M. N.; BORGES, O. M. M.; TORRES, L. M.; DANTAS, A. K. F. P.. Perfil Hematológico e Bioquímico de cães com Gastroenterite Hemorrágica por Parvovírus diagnosticados pelo método de imunocromatografia. **Acta Veterinaria Brasilica**. 5: p. 278 – 283, 2011.

MESTECKY, J. Saliva as a manifestation of common mucosal immune system. **Annals Of New York Academic Science**. 694: p.184 – 194, 1993.

MESTECKY, J.; MORO, I.; UNDERDOWN, B. J. Mucosal Immunoglobulins. In: OGRA, P. L.;MESTECKY, J.; LAMM, M. E.; STOBER, W.; BIENESTOCK, J.; MCGHEE, J. R (Ed.). **Mucosal Immunology**. 2th. Academic London, p.133 – 152, 1998.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **The Developing Human: Clinically Oriented Embryology**. W. B. Saunders Company / Trad. Edit. Guanabara Koogan: 1994.

NEMI, C. J.. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1th. Philadelphia, PA: Lea & Febiger: 1993.

NOOROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J., MCCARTHY, S., BETTERIDGE, D. J., WOLFF, S. P. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in niddm. **Diabetes**, v. 44, n. 9, p. 1054-1058, ISSN 0012-1797. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995TD62300008>, Sep 1995.

O'SULLIVAN, G.; G., DURHAM, P. J. K., SMITH, J. R., CAMPBELL, R. S. F. Experimentally induced severe canine parvoviral enteritis. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, n. 1, p. 1-4, ISSN 0005-0423. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1984SC86700001>, 1984.

OTTEN, M. A.; VAN EGMOND, M. The Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89). **Immunology Letters**, v. 92, n. 1-2, p. 23-31, ISSN 0165-2478. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000221166400005>, Mar 29 2004.

PARRA, M. D.; TECLES, F.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERO, J. J.. C-reactive protein measurement in canine saliva. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 2, p. 139-144, ISSN 1040-6387. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228055300007>, Mar 2005.

PEDERSON, E. D.; STANKE, S. R., WHITENER, S. J., et al.. Salivary levels of alpha(2)-macroglobulin, alpha(1)-antitrypsin, C-reactive protein, cathepsin G and elastase in humans with or without destructive periodontal disease. **Archives of Oral Biology**, v. 40, n. 12, p. 1151-1155, ISSN 0003-9969. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995TM24700011>, Dec 1995a.

PFUETZENREITER, M. R.; ZYLBERSZTAJN, A.; AVILA-PIRES, F. D. D. Evolução histórica da medicina veterinária preventiva e saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1661-1668, 2004-10, ISSN 0103-8478. Disponível em: <<Go to ISI>://SCIELO:S0103-84782004000500055>, 2004.

POLLACE, G.; CERAULO, S. The agglutinating properties of several body fluids during Malta Fever <original> Das agglutinations vermögene in igerkörperflüssig keitenbeim Mediterranfeber. **Central blatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.** 52: p. 268 – 275, 1909.

POLLOCK, R. V. H.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. (Ed.). **Infectious Diseases of the dog and cat.** Philadelphia: Saunders, p.268-281, 1990.

POTGIETER, L. N. D.; JONES, J. B.; PATTON, C. S.; WEBB-MARTIN, T. A.. Experimental parvovirus infection in dog. **Canadian Journal of Comparative Medicine-Revue Canadienne De Medecine Comparee**, v. 45, n. 3, p. 212-216, ISSN 0008-4050. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1981MG56400001>, 1981.

PRAKOBPHOL, A.; XU, F.; VAN, M.; LARSSON, T.; BERGSTROM, J.; JOHANSSON, I.; FRANGSMYR, L.; HOLMSKOV, U.; LEFFLER, H.; NILSSON, C.; BORE, T.; WRIGHT, J. R.; STROMBERG, N.; FISHER, S. J.. Salivary agglutinin, which binds Streptococcus mutans and Helicobacter pylori, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 39860-39866, ISSN 0021-9258. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000166039500012>, Dec 22 2000.

PRICKETT, J. R.; ZIMMERMAN, J. J. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews.** 2: p. 207 – 216, 2010.

PROCTOR, G. B. Muscarinic receptors and salivary secretion. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 4, p. 1103-1104, ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236854500004>, Apr 2006.

PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. **Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical**, v. 133, n. 1, p. 3-18, ISSN 1566-0702. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000246056400002>, Apr 30 2007.

PUSCHNER, B. Mushroom toxins. In: GUPTA, R. C. (Ed.). **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles.** Elsevier, San Diego, CS, USA, p.915 – 925, 2007.

RIBEIRO, L. S.; PROIETTI, F. A. Fibromialgia e estresse infeccioso: possíveis associações entre a síndrome de fibromialgia e infecções víricas crônicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 45, n. 1, p. 20-29, ISSN 0482-5004. Disponível em: <<Go to ISI>://SCIELO:S0482-50042005000100005>, 2005.

RINKINEN, M.; TEPO, A.; HARMOINEN, J.; WESTERMARCK, E.. Relationship between canine mucosal and serum immunoglobulin A (IgA) concentrations: Serum IgA does not assess duodenal secretory IgA. **Microbiology and Immunology**, v. 47, n. 2, p. 155-159, ISSN 0385-5600. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000180848700006>, 2003.

RIZZI, T. E.; MEINKOTH, J. H.; CLINCENBEARD, K. D. Normal hematology of the dog. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. (Ed.) **Schalm's Veterinary Hematology**, 6th ed., Ames: Wiley Blackwell, p. 177-810, 2010.

ROBERTS, C. K.; WON, D.; PRUTHI, S.; KURTOVIC, S.; SINDHU, R. K.; VAZIRI, N. D.; BARNARD, R. J. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 5, p. 1657-1665, ISSN 8750-7587. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000237358400033>, May 2006.

RÚPULO, B. S.; MIRA, J. G. S.; JUNIOR, O. K. Deficiência em IgA. **Journal Of Pediatrics**. 74: p. 6 – 9, 1998.

SALUD, O. M. D. L. WHO. **Geneva**. Informe Técnico: 111: p. 30, 1957.

SALUD, O. P. D. L. PAHO/WHO. Washington. Publicación Científica 313: p. 115, 1975.

SALVI, S.; HOLGATE, S. T. Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, n. 12, p. 1597-1605, ISSN 0954-7894. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084622700005>, Dec 1999.

SCHWABE, C. W. **Veterinary medicine and human health**. Baltimore: Williams & Wilkins: 680, 1984.

SECREÇÃO SALIVAR. **Fluídos**, Disponível em: <<http://www.angra.uac.pt/MPA/MPA/Páginas do Mestrado/Mestrado/Fisiologia/Pires/Fluidos-Mestrado.pdf>>. Acesso em: 16 de julho.

SELLON , K. S. Canine Viral Diseases: Canine Parvovirus. In: ETTINGER, S. J. e FELDMAN, E. C. (Ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. Philadelpia, U.S.A.: W.B. Saunders Company, p.646 – 647, 2005.

SELYE, H. STRESS AND DISEASE. **Science**, v. 122, n. 3171, p. 625-631, ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1955ZQ17600001>, 1955.

SHAKYA, V. K.; MIRaulia, K. S.; MAHESHWARI, P.; AGRAWAL, V. Efficacy of doramectin in nematodes infested dogs. **Veterinary Practitioner**. 14: p. 365 – 367, 2013.

SILVA, I. N. G.; GUEDES, M. I. F.; ROCHA, M. F. G.; MEDEIROS, C. M. O.; OLIVEIRA, L. C.; MOREIRA, O. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Hematological profile and electrophoretic evaluation of serum proteins of dogs with canine distemper. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 136-139, ISSN 0102-0935. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000228525400019>, Feb 2005.

SOUTH, M.; COOPER, M.; WOLLHEIM, F.; HONG, R.; GOOD R. The IgA system. I. Studies of the transport and immunochemistry of IgA in the saliva. **Journal of Experimental Medicine**. 123: p. 615 – 627, 1966.

SPERBER, G. H. **Craniofacial Embryology**. London. Butterworth: 1989.

STAATS, H. F.; JACKSON, R. J.; MARINARO, M.; TAKAHASHI, I.; KIYONO, H.; MCGHEE, J. R.. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Current Opinion in Immunology**, v. 6, n. 4, p. 572-583, ISSN 0952-7915. Disponível em: <

<Go to ISI>://WOS:A1994PC33000011 >, Aug 1994.

STRATAKIS, C. A.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Stress: Basic Mechanisms and Clinical Implications**, v. 771, p. 1-18, ISSN 0077-8923. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995BE92G00001 >, 1995.

STROTTMANN, D. M. V.; SCORTEGAGNA, G.; KREUTZ, L. C.; BARCELLOS, L. J. G.; FRANDOLOSO, R.; AZNZILIERO, D.. Diagnosis and serological study of canine parvovirus infection in dogs from Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 2, p. 400-405, ISSN 0103-8478. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255777100017 >, Mar-Apr 2008.

TOMASI, T.; ZIGELBAUM, S. The selective occurrence of gamma-1A globulins in certain body fluids. **Journal of Clinical Investigation**. 42: p.1552 – 1560, 1963.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 53, n. 4, p. 865-871, ISSN 0022-3999. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000178737100006 >, Oct 2002.

VALDEZ, I. H.; FOX, P. C. Interations of salivary and gastrointestinal system. **II Effects of salivary glands dysfunction on the Gastro tract Digestive Dysfunction**. 9: p. 210 – 218, 1991.

VINCENT, I. C.; MICHELL, A. R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 3, p. 342-345, ISSN 0034-5288. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1992LL42700011 >, Nov 1992.

VON BORELL, E. Neuroendocrine integration of stress and significance of stress for the performance of farm-animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 44, n. 2-4, p. 219-227, ISSN 0168-1591. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1995TE62100010 >, Sep 1995.

WENGER-RIGGENBACH, B.; BORETTI, F. S., QUANTE, S., SCHELLEMBERG, S., REUSCH, C. E., SIEBER-RUCKSTUHL, N. S. Salivary Cortisol Concentrations in Healthy Dogs and Dogs with Hypercortisolism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 551-556, ISSN 0891-6640. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000277416600017 >, May-Jun 2010.

WHITENER, S. J.; TURNER, D. W.; PEDERSON, E. D. C-reactive protein and a1-antitrypsin in human saliva as indicators of periodontal disease. **Northwest Dental Research**. 4: p. 26 – 29, 1994.

WHO. Preventing chronic diseases: a vital investment. Disponível em: <http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/order_form.pdf>, 2005.

WHO. Noncommunicable diseases and mental health,. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241597418_eng.pdf>, 2009.

WOODS, C. B.; POLLOCK, R. V. H.; CARMICHAEL, L. E. Canine parvoviral enteritis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 16, n. 2, p. 171-179, ISSN 0587-2871. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1980JM52000007 >, 1980.

ANEXO A – HEMOGRAMA

Animal: *Espécie:* Sexo: Data:
 Raça: Idade: Proprietário:
 Clínica: Veterinário resp.:

Hemograma

Eritrograma

	Resultado	Valores de referência
Hemácias (milhões/mm3)		3,5-7,0
HGB (g/dL)		8,5-17,0
VG%		26-47
VCM (fl)		50-83
HCM (pg)		20-25
CHCM (%)		30-35

Leucograma

	Resultado		Valores de referência	
	Relativo (%)	Absoluto (/mm3)	Relativo (%)	Absoluto (/mm3)
Leucócitos totais			8000-17000	
Blastos			raros	raros
Promielócitos			raros	raros
Mielócitos			raros	raros
Metamielócitos			raros	raros
Neutrófilos				
Segmentados		46-70	3760-11764	
Bastonetes		0-1	0-173	
Eosinófilos		1-5	0-960	
Basófilos		raros	0-160	
Linfócitos				
Típicos		28-45	1600-8304	
Atípicos		raros	raros	
Monócitos		1-10	0-1730	
Plaquetas (10³)			200-500	

APÊNDICE A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DOS ANIMAIS

FICHA IDENTIFICAÇÃO	
Animal Nº _____	T _____
Local Coleta: _____	
Ficha Clínica Nº: _____	
Nome: _____	Raça: _____
Idade: _____	Sexo: _____ Peso: _____ Kg
Quadro Clínico: _____	
Observações: _____ _____ _____	
HEMOGRAMA	
Hemácias: _____ $10^6/\text{mm}^3$	Hemoglobina: _____ g% Hematócrito: _____ %
VCM: _____ μm^3	CHCM: _____ g/dL
HCM: _____ pg	RDW: _____ %
Plaquetas: _____ / mm^3	
Leucócitos: _____ / mm^3	
Diferencial: _____ _____ _____	
Hemoparasitas: _____ _____ _____	
OUTROS: _____ _____ _____	