
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

BIOMARCADORES SALIVARES DO
EXERCÍCIO FÍSICO PARA DETERMINAÇÃO
DO LIMIAR ANAERÓBICO HUMANO.

Miguel Armando Bortolini Junior

UBERLÂNDIA – MG

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

BIOMARCADORES SALIVARES DO
EXERCÍCIO FÍSICO PARA DETERMINAÇÃO
DO LIMIAR ANAERÓBICO HUMANO.

Aluno: Miguel Armando Bortolini Junior

Orientador: Foued Salmen Espindola

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção do
título de Mestre em Genética e Bioquímica.

UBERLÂNDIA – MG

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
BIBLIOTECA

SISBI/UFU

210965

D

FU000277707

FICHA CATALOGRÁFICA

B739b

Bortolini Junior, Miguel Armando, 1977-

Biomarcadores salivares do exercício físico para determinação do limiar anaeróbico humano / Miguel Armando Bortolini Júnior. - Uberlândia, 2003.

130f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espíndola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Exercícios físicos - Aspectos fisiológicos - Teses. 2. Limiar anaeróbio - Teses. 3. Ácido láctico - Teses. 4. Proteínas salivares - Teses. I. Espíndola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:796.012.6:612 (043.3)

MENSAGEM

Um dia você acorda e pensa: Será que realmente "Nada é, mas Tudo está"?

Após este questionamento, tenho algumas palavras a dizer:

"Durante toda nossa vida, sempre se ganha e se perde;

Se ganha experiência e se perde juventude;

Se ganha dinheiro e se perde alegria;

Conquistamos o que queremos e perdemos o que não sabemos que necessitamos.

Perdemos muito tempo tentando ganhá-lo, não aproveitando o que temos.

Enfim, só sei que nada sei, pois o que é um grãozinho de areia comparado com

toda a praia. A única certeza que tenho no "hoje", é que só levarei para o

"amanhã", as boas ou não ações que realizei no "ontem".

Agradeco

À DEUS pela vida.

A todas as pessoas que deixaram sua marca em meu eterno amadurecimento.

A minha "mamãe" (Geni), minhas Irmãs (Márcia, Margot e Maria Luiza), cunhados (Cleuber e Marco), sobrinhos (Bruno, Bianca e Ângelo), minha Vó Albina, Dona Rejane, Zezé, Sô Ideraldo, Mariana.

A todos meus amigos, em especial Tataia, Todão e André.

Ao orientador Foued e co-orientador Guilherme, pela ajuda, atenção e amizade.

Aos companheiros de laboratório, Ismair, Luciana Duarte, Luciana Calábria, Cibele, Pablo, Letícia, P.C. Jr, Fátima, Romeu, Aníbal, Lorena, Léo, Renata, Michel, Viviane, Camila M., Camila G., Inês, Juliana Sayuri, Maurette, Juliana Hubaide, Daniela e Wilson.

À todos os colegas de pós-graduação: Tales, Juliana, Rodrigo, Gilvan, William, Renata, Veridiana, Adriana, Idessania, Ubirajara, Ana Candiada, Nádia, etc.

Aos alunos da 45ª turma de Educação Física da UFU, em especial aos amigos, Altamir Junior, Claudinha, Eluise e Marislene.

Ao Inri, Rimmel e Fabiano do Hospital de clínicas.

Aos voluntários desta dissertação.

A todos os funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, em especial a Marlene e Gerson e ao pessoal da segurança e limpeza.

Ao Laboratório de Fisiologia (Prof José Antônio Galo) pela ajuda científica nas dosagens de Sódio e Potássio e à Bete pela amizade e presteza.

Ao laboratório de Imunologia-ICBIM-UFU (Em especial Professoras, Deise, Mineu, Daniele e Cida), pela ajuda com análise de Óxido Nítrico.

Ao laboratório de Fisiologia da FAEFI-UFU (Em especial Prof. Guilherme). Pela ajuda com os testes no cicloergômetro e análises de lactato.

À Karen pelas sessões de acupuntura.

Ao professor Nilson Penha pela presteza e amizade profissionalmente e pessoalmente.

Ao professor Vilmar Baldissera pela atenção e cooperação.

E aos que por um déficit de memória temporária não estão aqui citados. 😊

A TODOS meu muito obrigado, do fundo do CORAÇÃO.

APOIO

UFU – pelo recurso financeiro.

FAEFI – Através do Laboratório de Fisiologia, dando suporte tanto nos testes no cicloergômetro como em análises.

Cardiologia do Hospital de Clínicas-UFU – Suporte ao “Projeto piloto” para esta dissertação.

Laboratório de Imunologia – ICBIM-UFU (Prof. Deise, Mineu e Cida), pelo suporte em parte das análises.

Ao Laboratório de Fisiologia (Prof. Galo), pelo suporte em parte das análises.

CAPES – Pela bolsa de mestrado.

LISTA DE ABREVEATURA

β -AR	Receptor adrenérgico do tipo beta
α -AR	Receptor adrenérgico do tipo alfa
AQP3 e 5	Aquapório do tipo 3 e do tipo 5.
AT ou LL	Anaerobic Threshold ou Limiar Lactato
ATP	Adenosina tri-fosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
Ca ⁺⁺	Íon Cálcio
cAMP	Adenosina mono-fosfato cíclico
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
cGMC	Guanosina mono-fosfato cíclico
Cl ⁻	Íon Cloro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
eNOS	Óxido Nítrico sintetase endotelial
FC	Média da Frequência Cardíaca do estágio
GMC	Guanosina mono-fosfato
IgA	Imunoglobulina do tipo A
iNOS	Óxido Nítrico sintetase induzível
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Íon Potássio
L-arg	L-Arginina
LSG	Lactato sanguíneo
LV	Limiar ventilatório
mAChR	Receptor muscarinicos.
Na ⁺	Íon Sódio
Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Sódio/Potássio Adenosina trifosfatase
NE	Nora epinefrina
nNOS	Óxido Nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintetase
PAT	Protein Anaerobic Threshold (Limiar anaeróbico de Proteínas Totais Salivares)
PRO	Proteína total salivar
sIgA	Imunoglobulina do tipo A - Secretória
SNO	s-Nitrositol
T _{ca}	Limiar de catecolaminas
Th _{1a}	Limiar lactato
T _{sa}	Limiar salivar
VO ₂	Capitação de oxigênio
VO _{2max}	Capitação máxima de oxigênio
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Formação da saliva.	
Figura 2	1º Mecanismo para secreção do fluido primário através da acinar salivar.	p.12
Figura 3	2º Mecanismo para secreção do fluido primário através da acinar salivar.	p.14
Figura 4	3º Mecanismo para secreção do fluido primário através da acinar salivar.	p.15
Figura 5	Esquema representando a transdução de sinal para a formação da saliva primária.	p.16
Figura 6	Formação do NO.	p.18
Figura 7	Mecanismos de liberação do NO no endotélio dos vasos.	p.31
Figura 8	Limiares PAT e AT. (225W) do voluntário "MAP".	p.34
Figura 9	Limiares PAT e AT. (225W) do voluntário "LGD".	p.72
Figura 10	Limiares PAT/W, PAT/FC, AT/W e AT/FC (225W) do voluntário "MAP".	p.72
Figura 11	Limiares PAT/W, PAT/FC, AT/W e AT/FC (225W) do voluntário "LGD".	p.73
Figura 12	Limiares AT, AT/W e AT/FC (225W) do voluntário "MAP".	p.73
Figura 13	Limiares AT, AT/W e AT/FC (225W) do voluntário "LGD".	p.74
Figura 14	Limiares PAT, PAT/W e PAT/FC (225W) do voluntário "MAP".	p.74
Figura 15	Limiares PAT, PAT/W e PAT/FC (225W) do voluntário "LGD".	p.75
Figura 16	Comportamento do NO (Padrão 2) no limiar anaeróbio (PAT).	p.75
Figura 17	Comportamento do NO (Padrão 1) no limiar anaeróbio (PAT).	p.100
Figura 18	Comportamento do NO (Padrão 2) no limiar anaeróbio (AT).	p.100
Figura 19	Comportamento do NO (Padrão 1) no limiar anaeróbio (AT).	p.101
Figura 20	Comparação do NO e da amilase no último estágio (Padrão 2).	p.101
Figura 21	Comparação do NO e da amilase no último estágio (Padrão 1).	p.102
Figura 22	Figura esquemática de uma placa de Elisa.	p.102
Figura 23	Diagrama dos comprimentos de onda.	p.114
Figura 24	Diagrama da curva de emissão.	p.121
		p.122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Principais agentes microbicidas da saliva total humana.	p.10
Tabela 2	Vantagens potenciais das amostras de saliva sobre amostras de soro.	p.11
Tabela 3	Fatores que influenciam na composição da saliva total humana.	p.21
Tabela 4	Tabela de instruções prévias para coleta de saliva no teste ergométrico.	p.22
Tabela 5	Doenças sistêmicas que afetam glândulas salivares e saliva.	p.22
Tabela 6	Componentes mensurados na saliva.	p.24
Tabela 7	Metabólitos oxidados do nitrogênio.	p.30
Tabela 8	Correlação de Pearson ($\alpha < 0,05$) e t-STUDENT para amostras pareadas entre o "AT" e "PAT".	p.66
Tabela 9	Média com desvio padrão e intervalo de confiança das médias dos limiares de lactato e proteína e total da saliva.	p.67
Tabela 10	Média das "FC" de cada estágio.	p.68
Tabela 11	Médias e intervalo de confiança da concentração de proteína total dos 15 voluntários em repouso e 30 minutos após o teste.	p.68
Tabela 12	Valores individuais	p.69
Tabela 13	Valores individuais das concentrações de lactato sanguíneo em mmol/L.	p.70
Tabela 14	Valores individuais das concentrações de proteína total salivar em mg/mL.	p.71
Tabela 15	Comparações dos dois padrões de resposta de no salivar durante o exercício em ciclo ergômetro com cargas crescentes.	p.93
Tabela 16	Atividade da amilase salivar durante o teste	p.94
Tabela 17	Valores individuais	p.95
Tabela 18	Valores individuais da concentração de lactato sanguíneo em mmol/L.	p.96
Tabela 19	Valores individuais da concentração de proteína total salivar em mg/mL.	p.97
Tabela 20	Valores individuais da atividade da amilase salivar em U/L.	p.98
Tabela 21	Valores individuais da concentração de óxido nítrico salivar em $\mu\text{mol/L}$.	p.99
Tabela 22	Preparação da curva padrão de BRADFORD.	p.112
Tabela 23	Tabela de tempo da colocação do reagente de BRADFORD.	p.112
Tabela 24	Tabela de tempo da leitura da amostra.	p.112
Tabela 25	Tabela de instruções prévias para coleta de saliva no teste ergométrico.	p.124
Tabela 26	Receita para fazer 2L do tampão "YSI" para lactímetro.	p.126

INDICE

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1	Introdução	5
1.2	Limiar	5
1.3	Marcadores Biológicos	7
1.3.1	Exposição:	7
1.3.2	Efeito:	7
1.3.3	Susceptibilidade:	8
1.4	Saliva	8
1.4.1	Por que utilizar saliva?	11
1.4.2	Glândulas salivares: Histologia e Neurofisiologia	12
1.4.2.1	Histologia	12
1.4.2.2	Neurofisiologia	16
1.4.3	Nomenclaturas	18
1.4.3.1	Saliva total:	19
1.4.3.2	Saliva parotídica:	19
1.4.3.3	Saliva submandibular:	19
1.4.3.4	Saliva submandibular/sublingual:	19
1.4.3.5	Secreções das glândulas salivares menores:	19
1.4.3.6	Fluido crevicular gengival:	19
1.4.3.7	Fluido oral:	19
1.4.3.8	Saliva não-estimulada:	20
1.4.3.9	Saliva estimulada:	20
1.4.4	Métodos de coleta da saliva	20

	2
1.4.4.1 Método da drenagem: _____	20
1.4.4.2 Método de cuspe: _____	20
1.4.4.3 Método de sucção: _____	20
1.4.4.4 Método do bastão: _____	21
1.4.5 Influenciadores salivares _____	21
1.4.6 Problemas clínicos no qual a saliva contribui para diagnóstico	23
1.4.7 Saliva, drogas e seus mensuramentos _____	23
1.5 Componentes salivares orgânicos _____	24
1.5.1 Proteína Total _____	24
1.5.2 Alfa-amilase salivar _____	25
1.5.3 Lactato salivar _____	28
1.6 Componentes salivares inorgânicos _____	29
1.6.1 Óxido nítrico _____	29
1.6.1.1 Introdução _____	29
1.6.1.2 Nomenclatura _____	31
1.6.1.3 Atividade Óxido Nítrico relacionada _____	31
1.6.1.4 Saliva, NO e Exercício Físico _____	32
1.6.2 Saliva e eletrólitos _____	38
1.7 Conclusão _____	39
1.8 Referências Bibliográficas _____	41
2 CAPITULO I: Proteína total salivar: um novo método para determinação do limiar anaeróbico. _____	57
2.1 Resumo _____	57
2.2 Introdução _____	58
2.3 Método _____	60

	3
2.3.1	Voluntários _____ 60
2.3.2	Teste ciclo ergométrico _____ 61
2.3.3	Coleta da saliva _____ 61
2.3.4	Coleta do sangue _____ 62
2.3.5	Análise estatística _____ 62
2.4	Resultados: _____ 63
2.5	Discussão _____ 76
2.6	Agradecimentos _____ 79
2.7	Referências Bibliográficas _____ 80
3	CAPÍTULO II - Avaliação do NO salivar durante exercício físico em cicloergômetro. _____ 83
3.1	Resumo _____ 83
3.2	Introdução _____ 84
3.3	Método _____ 88
3.3.1	Voluntários _____ 88
3.3.2	Teste ciclo ergométrico _____ 88
3.3.3	Coleta da saliva _____ 89
3.3.4	Coleta do sangue _____ 89
3.3.5	Análise estatística _____ 90
3.4	Resultados _____ 91
3.5	Discussão _____ 103
3.6	Referências Bibliográficas _____ 107
4	ANEXOS _____ 111
4.1	ANEXO- I - ANÁLISE DE PROTEÍNA _____ 111
4.2	ANEXO- II - ANÁLISE DO ÓXIDO NÍTRICO NA SALIVA _____ 113

4.3	ANEXO- III - COLETA E ANÁLISE SANGUÍNEA _____	116
4.4	ANEXO- IV - ANÁLISE DA AMILASE SALIVAR POR CLORONITROFENOL _____	117
4.5	ANEXO- V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO _____	118
4.6	ANEXO- VI - OPERAÇÃO DO FOTÔMETRO _____	119
4.7	ANEXO- VII - PROTOCOLO DE COLETA DE FLUXO SALIVAR	123
4.8	ANEXO- VIII - PROTOCOLO DE ANÁLISE DO LACTATO _____	126
4.9	ANEXO- IX - CARTA DE ESCLARECIMENTO _____	128
4.10	ANEXO- X- COLETA E ARMAZENAGEM DE SALIVA DURANTE O TESTE ERGOMÉTRICO. _____	129

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

A saliva vem sendo muito pesquisada nos últimos 20 anos. Ela oferece diversas vantagens, em relação a outros fluidos, no monitoramento de biomarcadores do estado fisiológico do organismo. Alguns destes biomarcadores salivares, filtrados do sangue (lactato, cortisol e óxido nítrico) ou próprios das glândulas salivares (amilase salivar, o sódio, o potássio, e agora a proteína total), podem avaliar a capacidade física dos indivíduos. Assim, dar-se-ão definições de termos e esclarecimentos chaves, para uma melhor compreensão desta dissertação.

1.2 LIMIAR

A palavra limiar é um substantivo masculino que tem sua origem do latim *Liminare*, tendo vários significados, tais como: "entrada", "começo", "início", "Fisiologia: Intensidade mínima abaixo da qual um estímulo deixa de produzir uma determinada resposta" (FERREIRA, 1986).

A capacidade anaeróbica de um indivíduo é mensurada de várias formas nos dias de hoje, biomarcadores salivares são exemplos. Pesquisas a respeito desta capacidade, já vêm sendo realizadas de longa data. Wasserman e McIlroy (1964) introduziram o termo "Limiar Anaeróbico" (Lan) e propuseram o uso de parâmetros ventilatórios para detectar o início da acidose metabólica durante o exercício de cargas progressivas. E Mader et al., (1976) definiram o termo "Limiar-aeróbio-anaeróbico" (LL) para identificar a intensidade do exercício correspondente à 4mmol/L de lactato sanguíneo. No mesmo ano Davis et al., (1976) encontram uma alta correlação entre Limiar Ventilatório (LV) e Limiar de Lactato (LL) ($r = 0,95$). O LL foi definido no estudo de Wasserman (1984), como sendo "o nível de VO_2 durante o exercício no qual a energia aeróbia é suplementada por mecanismos anaeróbicos". E redefinido como sendo "o ponto de inflexão da lactatemia, caracterizado pela transição do aumento linear para exponencial" (WASSERMAN, 1986).

Com a descoberta do aumento da atividade adrenérgica durante um exercício submáximo com incremento de cargas (GLEIN et al., 1984; LEHMANN et al., 1985), sugeriu-se que este aumento estava correlacionado com o aumento do lactato sangüíneo, sendo “o ponto de aumento da concentração de epinefrina plasmática” (Th_{ca}) podendo estar correlacionado ao limiar de lactato sangüíneo (AT) (GREEN, et al., 1983; MAZZEO e MARSHALL, 1989), sendo mais tarde confirmado (NEDERFORS e DAHLÖF, 1992; CHICHARRO et al., 1994).

Em Simões et al., (1998) encontrou-se uma relação entre concentração de lactato e glicemia, propondo-se a determinação de limiar anaeróbico através de dosagens glicêmicas.

Além dessa forma de se identificar o limiar anaeróbico, foi proposta uma forma não invasiva: limiar salivar (Th_{sa}). Esse foi feito por análise da mudança da composição da saliva durante exercício cicloergométrico com incremento de cargas e definido como “o ponto no qual houve o 1º aumento contínuo de um deles (Cl , Na^+ ou K^+) que ocorre durante o exercício”, (CHICHARRO et al., 1994) Neste mesmo trabalho, definiu-se também o limiar de catecolaminas (Th_{ca}), como “o ponto no qual ocorreu um aumento não linear em um deles (nora-adrenalina ou adrenalina)” (CHICHARRO et al., 1994). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o Th_{sa} e os outros métodos de identificação. Além disso, altas correlações foram encontradas entre o Th_{sa} e limiar de lactato sangüíneo (Th_{la}) ($r = 0,82$, $P < 0,01$) e Th_{sa} e Th_{ca} ($r = 0,75$, $P < 0,05$) (CHICHARRO et al., 1994). Mais tarde o mesmo limiar salivar foi determinado pela análise da concentração de amilase salivar (T_{sa}), na saliva total, durante teste ergométrico em esteira. O ponto de limiar foi definido como sendo, “o ponto no qual o 1º aumento contínuo da amilase salivar ocorre durante o exercício”. Neste estudo foram usados 20 voluntários homens; idade 21 ± 3 anos; altura $176,1 \pm 6,4$; peso $69,9 \pm 8,6$; Os testes foram realizados em esteira, mantendo a inclinação em 1% e aumentando-se a velocidade em 0,28m/s a cada 3 minutos (CALVO et al., 1997). O mesmo grupo de pesquisa que propôs o limiar salivar (T_{sa}), o redefiniu como sendo, “o

ponto durante o exercício no qual os níveis da alfa-amilase salivar e eletrólitos (especialmente Na^+) também começam a aumentar acima dos níveis basais” (CHICHARRO et al., 1998).

Um importante dado em relação à avaliação física, é que a variação diurna na temperatura do corpo assim como outras respostas fisiológicas, para corrida, na velocidade de limiar de lactato, não é afetada. No entanto, um longo aquecimento pode ser requerido nos teste matutinos, devido ao baixo aumento da temperatura corporal, que pode ter um impacto na resposta ventilatória e na avaliação da percepção de esforço (MARTIN; DOGGART; WHYTE, 2001).

1.3 MARCADORES BIOLÓGICOS

Marcadores biológicos, como definido pelo National Research Council Committee on Biological Markers, são “*indicadores de eventos sinalizantes no sistema biológico ou em amostras*” (National Research Council, 1989; apud SILBERGELD, E.K. 1993)

Segundo a National Research Council, (1989 apud SILBERGELD, 1993) os biomarcadores podem ser classificados em três tipos: Exposição, efeito e susceptibilidade.

1.3.1 EXPOSIÇÃO:

Este é uma substância exógena, ou seus metabólitos, ou o produto de integração entre um agente xenobiótico e alguma molécula alvo ou célula, que é mensurado em um compartimento dentro de um organismo.

Ex.: Concentração de chumbo sangüíneo; concentração de mercúrio no cabelo; precursores do grupo heme.

1.3.2 EFEITO:

Este pode ser um mensurável bioquímico ou fisiológico, ou outra alteração contida em um organismo que, dependendo da magnitude, pode ser reconhecido como um prejuízo estabilizado ou em potencial de saúde ou de uma doença.

Ex.: Proporção da subpopulação dos linfócitos T.; concentração da proteína total salivar; atividade da amilase salivar, α -2-microglobulina; concentração de Na^+ salivar.

1.3.3 SUSCEPTIBILIDADE:

Este é um indicador de uma limitação natural ou adquirida de uma habilidade dos organismos para responder ao desafio de exposição para uma substância xenobiótica específica.

Ex.: Ferro sanguíneo: Deficiência de ferro; ALA urinária: Porfiria hereditária;

1.4 SALIVA

A palavra saliva originada do Latim *saliva* quer dizer "líquido transparente e insípido, segregado pelas glândulas salivares," ... (FERREIRA, 1986).

A saliva conhecida por nós, é conceitualmente chamada de *saliva total*, essa é um complexo das secreções das glândulas parótidianas, submandibulares, sublinguais e menores, além de fluido cervical e gengival, mais produtos da mucosa oral, mais leucócitos, resíduos celulares e epiteliais (GUILBAULT e PALLESCHI, 1995). Seu principal componente, em quantidade, é a água, perfazendo 90% do total. A saliva é hipotônica em relação ao seu principal formador, o plasma (CHICHARRO et al., 1994).

A análise de biomarcadores salivares representa uma importante alternativa de monitoramento do exercício físico, pois a saliva não tem sido só utilizada como um fluido marcador do estado fisiológico normal, fisiopatológico (GUILBAULT e PALLESCHI, 1995), mas também do fisiológico do exercício (CHICHARRO et al., 1994, 1998; CALVO et al., 1997). Pesquisadores analisaram alguns destes biomarcadores salivares (em humanos), tais como, IgA, proteína total, alfa amilase salivar, eletrólitos (RANTONEN e MEURMAN, 2000; WALSH et al., 1999; CHICHARRO et al., 1994, 1998; CALVO et al., 1997) e descobriram correlações entre a concentração de lactato sanguíneo com a atividade da alfa amilase e concentração de eletrólitos (CHICHARRO et al., 1994, 1998; CALVO et al., 1997).

A saliva não estimulada sofre influência de muitos fatores, o principal é o grau de hidratação (HOLMENS, 1964 apud NAVAZESH, 1993), mas também pode ser influenciada devido à exposição à luz, ao estímulo gustatório, ao estímulo mastigatório, ao estímulo olfatório, ao posicionamento do corpo (NAVAZESH, 1993), às estações do ano, ao horário do dia (ciclo circadiano) (SHANNON, 1966; DAWES, 1974 apud NAVAZESH, 1993), a medicamentos (estes são dependentes da composição e do fluxo), à natureza do estímulo, à duração do estímulo e ao tamanho das glândulas (NAVAZESH e SHIP, 1983; SREEBNEY, 1989; SREEBNEY e BROICH, 1989; DAWES, 1969 e 1984; DAWES, et al., 1978 apud NAVAZESH, 1993).

Várias funções foram atribuídas a saliva: A saliva é importante para manutenção da saúde dental, da mucosa oral, dos tractos esofágico e gastrointestinal (HERRERA et al., 1988; MANDEL, 1987; VALDEZ e FOX, 1991), e quaisquer alterações na quantidade ou qualidade da saliva pode alterar o estado de saúde (LENANDER-LUMIKARI et al., 2000). Segundo Mandel (1987) a saliva também tem outras vantagens: Lavagem da cavidade oral (agregação, manutenção do pH, e integridade dos dentes); Proteção (antibacteriana, antifúngica, lubrificação, manutenção da integridade da mucosa oral, ajuda na reparação tecidual oral, manutenção do balanço ecológico oral); Excreção (balanço da hidratação). E Prakobphol et al., (2000), atribuiu outras funções à saliva, como a digestão e a formação de barreira semipermeável bioativa que recobre a superfície oral e regula a composição de sua flora. E complementou dizendo que a saliva realiza a função de proteção pela sua atividade microbicida e capacidade de promover a remoção seletiva de micróbios ou aderência devido a muitos de seus componentes, (incluem amilases, cistatinas, proteínas ricas em prolina, glicoproteínas ricas em prolina, anidrases carbônica, peroxidases, estaterinas, histatinas, lactoferrina, lisozima, sIgA, mucinas e aglutinina).

Os principais componentes da saliva das glândulas submandibular e sublingual são: mucinas, amilases, cistatinas, proteínas ricas em prolina e estaterinas (RAMASUBBU et al., 1991).

Tabela - 1

PRINCIPAIS AGENTES ANTIMICROBIANOS DA SALIVA TOTAL HUMANA	
AGENTE	ALVO PRINCIPAL/FUNÇÃO
FATORES IMUNES	
IgA secretório IgM IgG	Inibidor da adesão Acentuador da fagocitose Acentuador da fagocitose
FATORES NÃO IMUNE E INATO	
Salivar e mieloperoxidase Lisozima Lactoferrina Aglutinina Histatinas (Peptídeos ricos em Histidina) PRPs (Proteínas ricas em prolina) Cistatinas Leucócitos polimorfonucleares	Antimicrobicida, e decomposição de H ₂ O ₂ Bactéria gram-positiva - Cândida Bactéria gram-positiva e gram-negativa Aglutinação/agregação de um número de microorganismos Antibacteriana e antifúngica Antibacteriana e antifúngica Antiviral Fagocitose

Fonte: TENOVUO, J., 1998.

Segundo VAN DER REIJDEN, (1993) a viscosidade (média entre taxa de cisalhamento e força de cisalhamento) da saliva depende da taxa de cisalhamento (shear rate) e do tempo. A saliva pode assim ser classificada como um fluido não newtoniano. A eficácia da saliva como um lubrificante, depende de sua viscosidade e como ela pode mudar com a sua taxa de cisalhamento (WATERMAN, 1998). Sabe-se que não há diferença de viscosidade salivar entre os sexos, os quais não são afetados pela variação das viscosidades salivares e taxa de fluxo salivar (RANTONEN e MEURMAN, 1998).

Segundo Dawes, (1993) o fluxo normal da saliva não estimulada é de 0.3 mL/min, mas a faixa de normalidade é extremamente grande. Um ponto muito importante é que a boca seca (Xerostomia) pode ser aplicada para um paciente, não somente quando o fluxo salivar é zero, mas quando a taxa de fluxo é reduzida a 40-50% do valor normal para aquele paciente.

É sugerido por Bishop et al., (2000), que o volume de fluido ingerido pode ter uma influência importante tanto na taxa de fluxo salivar como na concentração de IgA, durante um exercício submáximo ou prolongado num ambiente termoneutro. E sugere também que uma bebida com carboidrato desenvolve um importante papel na resposta da taxa de fluxo salivar durante a recuperação do exercício.

1.4.1 POR QUE UTILIZAR SALIVA?

A análise da saliva ou do suor oferece vantagens, em relação à outros fluidos como: a facilidade na coleta (podendo ser coletadas mais freqüentemente e com muito menos estresse do paciente), a coleta ser não invasiva, a coleta possibilitar amostragem de grupos populacionais especiais (crianças, idosos, atletas, sedentários, etc) e em circunstâncias que seriam inviáveis à coleta de urina ou soro. A saliva não contaminada com sangue é considerada como de biosegurança de classe I, de acordo com o Centro de Doenças do Estados Unidos, sendo segura para a manipulação pelos pesquisadores dos laboratórios envolvidos em pesquisa com saliva (SHIRTCLIFF et al. 2000).

Tabela – 2

VANTAGENS POTENCIAIS DAS AMOSTRAS DE SALIVA SOBRE AMOSTRAS DE SORO.		
<i>Mais aceitabilidade</i>	<i>Mais conveniente</i>	<i>Mais versátil</i>
Não invasiva	Coleta própria,	Populações de difícil alcance,
Sem dor	Coleta barata	por exemplo, usuário de
Menor recusa	Rápido e simples	drogas e grandes grupos
	Sem precaução de esterilidade.	populacionais (idosos,
		crianças etc.).

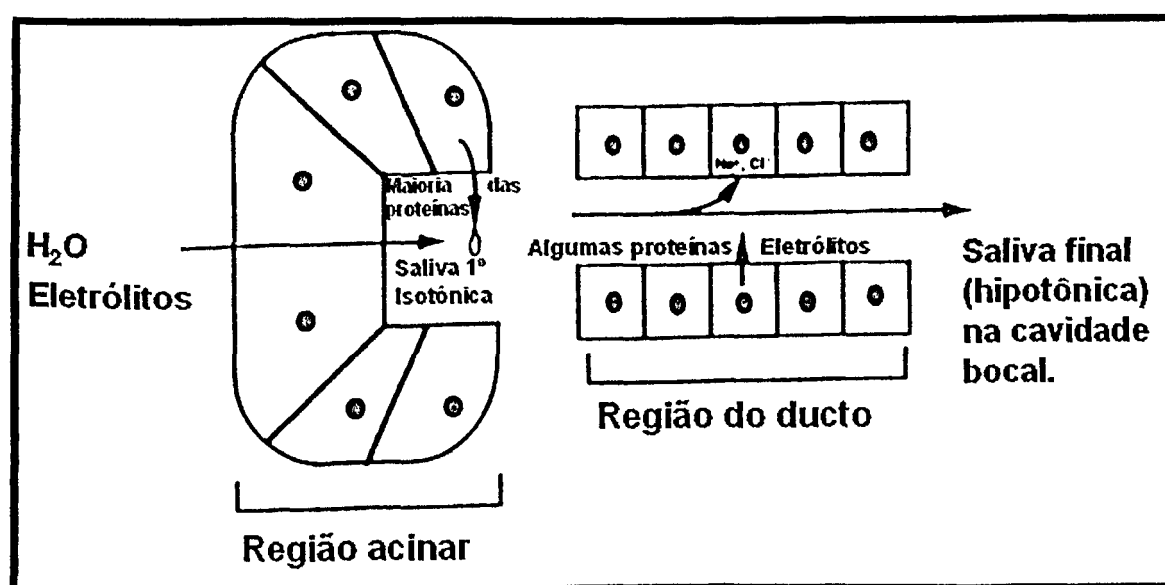
Fonte: PARRY, 1993.

1.4.2 GLÂNDULAS SALIVARES: HISTOLOGIA E NEUROFISIOLOGIA

1.4.2.1 Histologia

As glândulas parótidas, na nossa espécie são praticamente glândulas serosas, pois nas suas secreções faltam mucinas, já as submaxilares e sublinguais são uma mistura de secreções serosas e mucosas. As glândulas salivares são estruturas tubuloalveolares onde está a acina (células terminais secretórias) e sistemas de ramificação de ductos, que levam a saliva da região acinar para cavidade oral. Estes ductos são referidos como ductos intercalados, estriados e secretores. Sendo assim, os principais parênquimas das glândulas salivares são o acinar e o dútico, os quais participam da excreção salivar.

Figura – 1. Formação da saliva.



Fonte: BAUM, 1993.

No lúmen das células acinares há a secreção de fluido e da maioria (85%) das proteínas exócrinas das glândulas (YOUNG e VAN LENNEP, 1979). O componente do fluido é derivado da rede vascular na forma de um isotônico (i.e., ~140 miliequivalente (mEquiv)/L NaCl). Este fluido primário é conduzido pelo sistema de ductos (de 4 a 5 tipos de células distintas) até a cavidade oral. As células acinares são permeáveis a água enquanto as do ducto não. A formação da saliva final, através do ducto, é feita com uma considerável

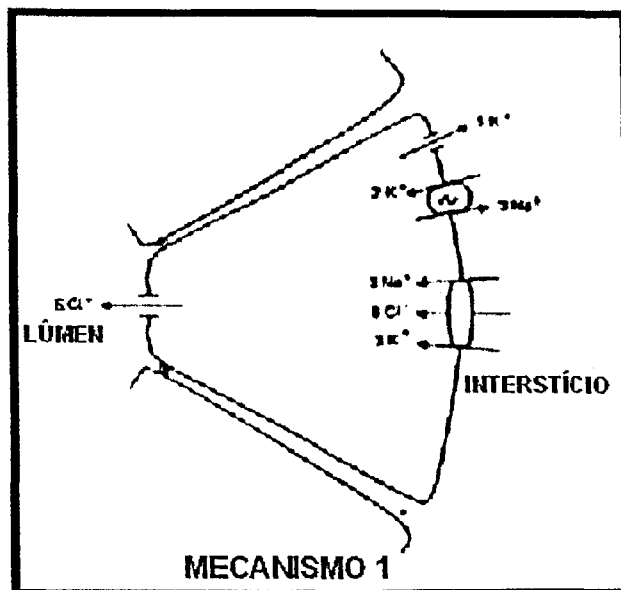
ocorrência de fluxo de eletrólitos. Grande parte do Na^+ e Cl^- , são reabsorvidos e uma pequena quantidade de K^+ e HCO_3^- são secretados junto com uma pequena parte de proteínas. Assim, finalmente a saliva é secretada na região bucal, valendo ressaltar sua hipotonia (25mEq/L NaCl) (THAYSE et al., 1954 apud BAUM, 1993; YOUNG e VAN, 1979).

A principal via do transporte de água, através do epitélio secretor, para a formação da saliva está ligada a osmolaridade. Esta secreção salivar parece estar envolvida com a rede de canais de água das glândulas, o aquapório, em especial o do tipo 3 (AQP3) que está localizado na membrana basolateral das células acinares e o do tipo 5 (AQP5) localizado na membrana do lúmen. (GRESZ, 2001).

Baseados em estudos com glândulas salivares de coelho e ratos, três mecanismos ou modelos foram propostos para secreção do fluido primário através da acinar salivar (TURNER, 1993).

Mecanismo 1: Ele é um combinado de 4 sistemas de membranas de transporte. (i) Os co-transportadores de íons Na^+ , K^+ e 2Cl^- localizados na membrana basolateral das células acinares. (ii) O canal de K^+ que é ativado por um íon Ca^{++} basolateral. (iii) Uma via de condutividade apical por íon Cl^- presumivelmente canal de Cloro que é ativado por íon Ca^{++} . (iv) A Na^+/K^+ ATPase. (ver figura 2). Secretagogos estimulados levam ao aumento da concentração de íon Ca^+ intracelular, assim ativando os canais de íon Cl^- e K^+ . Retirado o estímulo à concentração de íon Ca^{++} diminui fechando os canais de íon Cl^- e K^+ , voltando suas concentrações no lúmen a níveis do repouso. Estas coações prolongam-se com a estequiometria conhecida dos co-transportadores de sódio, potássio e cloro ($\text{Na}^+:\text{K}^+:2\text{Cl}^-$) e Na^+/K^+ ATPase ($3\text{Na}^+:2\text{K}^+:1\text{ATP}$). Neste modelo seis íon Cl^- são transportados a para cada ATP gasto (SILVA, 1977; PETERSEN e MARUYAMA, 1984 apud TURNER, 1993).

Figura - 2.

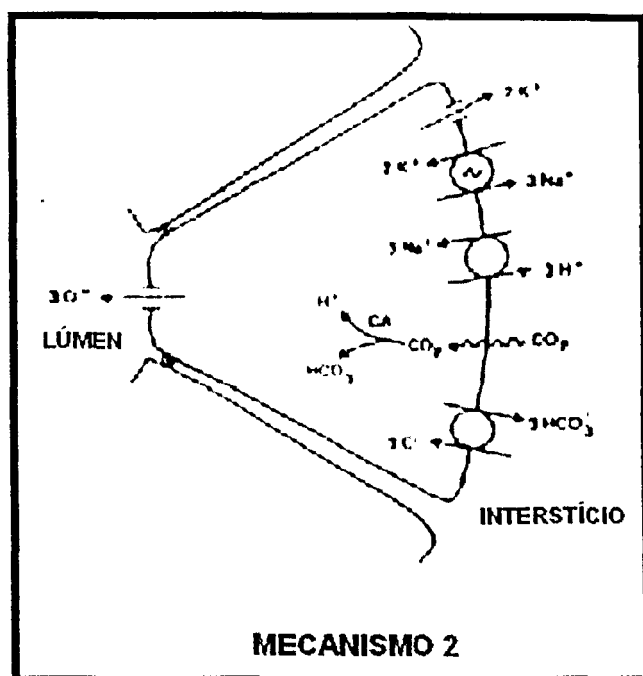


Mecanismo 1 para a hipótese de secreção do fluido primário

Fonte: TURNER, 1993.

Mecanismo 2: Este mecanismo é similar ao primeiro, no entanto nele os co-transportadores basolateral de íons Na^+ , K^+ e 2Cl^- são substituídos pelos trocadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ em paralelo com o trocador Na^+/H^+ . A concentração do cloro intracelular cai, resultado da indução do secretagogo pela perda de KCl , levando a um aumento do cloro interno trocado por HCO_3^- , via trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. A acidificação do citoplasma resulta na perda do bicarbonato tamponado pelo trocador Na^+/H^+ , que usa o gradiente de sódio, extracelular e intracelular, gerado pela Na^+/K^+ ATPase ($3\text{Na}^+:2\text{K}^+:1\text{ATP}$) para conduzir os prótons para fora da célula (SILVA, 1977; PETERSEN e MARUYAMA, 1984 apud TURNER, 1993).

Figura - 3

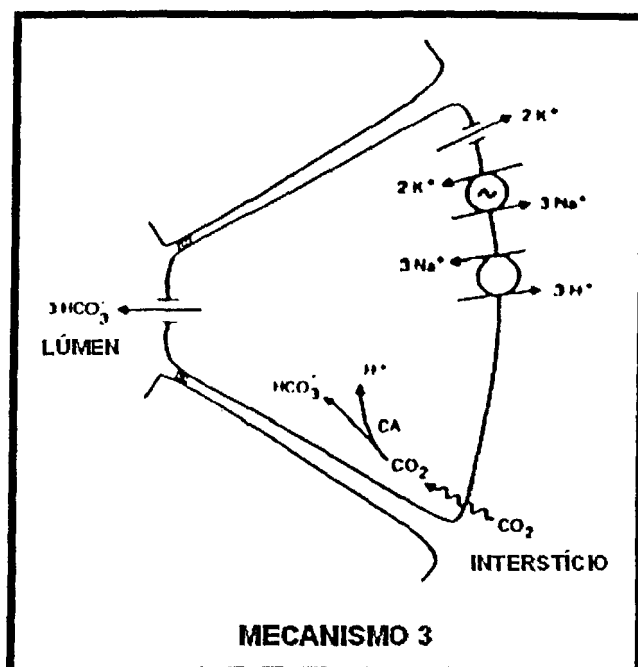


Mecanismo 2 para a hipótese de secreção do fluido primário.

Fonte: TURNER, 1993.

Mecanismo 3: Este mecanismo envolve a secreção de bicarbonato acinar. O CO_2 entra nas células acinares através da membrana basolateral e em meio aquoso ele é convertido em HCO_3^- mais o próton (H^+) pela anidrase carbônica. Ao HCO_3^- é permitido atravessar a membrana apical via canal de ânions, possivelmente pelo mesmo canal envolvido na secreção de cloreto. O próton é expulso pelo trocador de Na^+/H^+ basolateral. Neste modelo três íons bicarbonatos são secretados por ATP hidrolisado (YOUNG et al., 1987; PETERSEN e GALLANCHE, 1988; MELVIN et al., 1988; LAU, et al., 1989, apud TURNER, 1993).

Figura - 4



Mecanismo 3 para a hipótese de secreção do fluido primário.

Fonte: TURNER, 1993.

As artérias que suprem a parótida são derivadas da artéria carótida externa. A glândula sublingual é suprida pelas artérias sublingual e submental e a glândula submandibular é suprida por um ramo da artéria facial e lingual (WILLIAMS, 1980). A densidade de capilar que supre a região do ducto é menor que a que supre a região acinar, para suportar o transporte ativo ao longo do ducto (DAVENPORT, 1992). A estimulação parassimpática causa vasodilatação dos vasos que suprem as glândulas salivares, resultando em um acentuado aumento do fluxo sanguíneo (SCHNEYER; YOUNG; SCHNEYER, 1972; SUDDICK e DOWD, 1986). O pico de fluxo sanguíneo nas glândulas salivar poderia ser 10 vezes mais alto, por peso relativo de tecido, do que nos músculos contráteis (SCHNEYER; YOUNG; SCHNEYER, 1972).

1.4.2.2 Neurofisiologia

Todas as respostas das glândulas salivares humanas ocorrem com a estimulação de neurotransmissores (GARRET, 1982; BAUM, 1987). As glândulas são inervadas tanto pelos nervos simpáticos como pelos

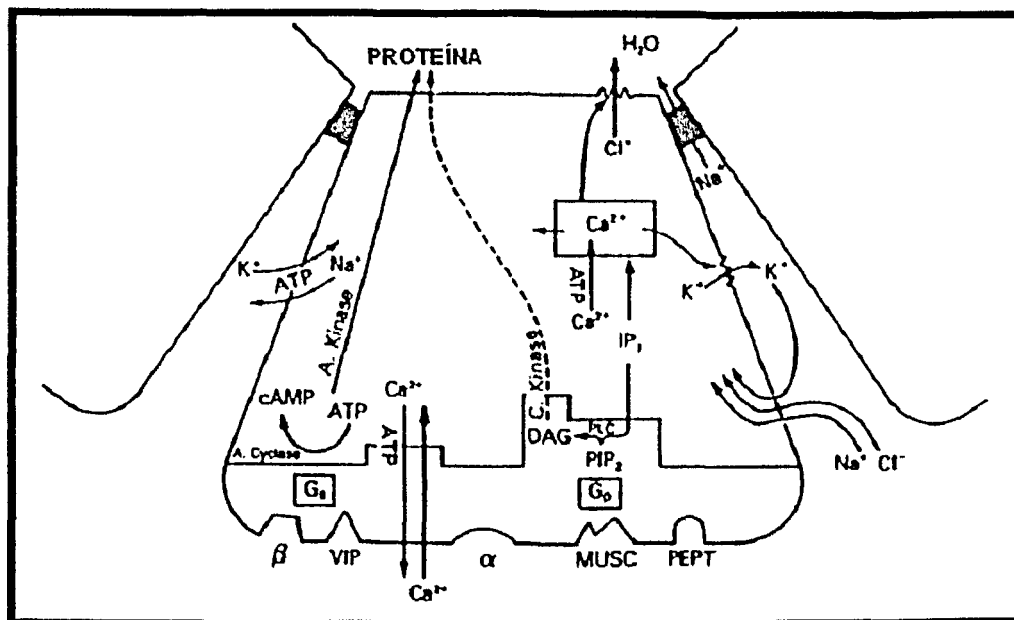
parassimpáticos (Nervos Autônomos). A estimulação simpática (via noraepinefrina) leva a alta secreção de proteínas enquanto que a parassimpática (via acetilcolina) leva a produção de fluidos. Os nervos anatômicos são adjacentes às células acinares e aos ductos, sugerindo que eles podem ter um papel fundamental na resposta regulatória em todos os tipos de células das glândulas salivares (SCHNEYER, 1976; DENNISS, e YOUNG, 1978) e suas composições seguem o ciclo circadiano (DAWES, 1972, 1975; apud KIVELÄ, et al., 1997). Há boas evidências de que a estimulação simpática nas glândulas salivares é aumentada, por exemplo, com mastigação, e quando superposta na estimulação parassimpática tem um efeito sinergista na fluidez e no fluxo salivar (JOHNSON, 1987; EMMOL/LELIN e GJORSTRUP, 1976; ASKING, et al., 1979, apud TURNER, 1993).

A secreção salivar é regulada pelo arco reflexo, consistindo de receptores e nervos aferentes, conexão central e nervos e receptores eferentes agindo no órgão efetor (células das glândulas salivares). Estes estímulos, sendo mediados por quimiorreceptores (ex.: pela goma de mascar) nos pontos de gustação e mecanorreceptores (ex.: pela goma de mascar e tablete de parafina) no ligamento periodontal, representam a maioria da produção aferente, levando a despolarização e aumento da taxa de fluxo salivar (KERR, 1961 apud JENSEN; KARATSAIDIS; BRODIN, 1998).

A percepção do gosto ocorre como consequência da ativação dos pontos gustatórios, nas papilas gustatórias linguais, que resulta da estimulação da salivação. O gosto azedo tem se mostrado o mais potente estímulo para o reflexo gustatório salivar, seguido por salgado, doce e amargo (KERR, 1961 apud JENSEN; KARATSAIDIS; BRODIN, 1998).

A secreção de proteína na saliva humana tal como, amilase, estaterina e histidina, são mediadas por receptores β -adrenérgico (JENSE et al., 1991; JENSEN, et al., 1994). A noraepinefrina (NE) possui extrinsecamente atividade α - e β -adrenérgicas, que se ligam aos seus receptores α - e β -adrenérgicos (α -AR e β -AR) e a acetilcolina se liga a receptores muscarínicos (mAChRs) (KERLAVAGE et al., 1987).

Figura – 5



Transdução de sinal para a formação da saliva primária. Fonte: BAUM, 1993.

Há várias hipóteses a respeito do processo de transdução de sinal nas glândulas salivares. Os dois melhores estudos a respeito deste processo são (i) a geração de cAMP seguindo a estimulação β -AR, o qual leva a exocitose de proteínas; (ii) a formação de 1,4,5-inositol trifosfato (IP_3) após a estimulação dos mAChR (Receptor muscarínico) o qual leva a mobilização de Ca^{++} e subseqüentemente a formação de fluido (BAUM, 1993). A estimulação dos receptores β -adrenérgicos, leva ao aumento da concentração de cAMP que ativa a quinase A, fosforilando ou desfosforilando várias proteínas celulares e secretando amilase (parótida) e glicoproteínas (submandibular) (BUTCHER et al., 1976; QUISSEL et al., 1981 apud BAUM, 1993). O receptor de IP_3 também funciona como liberador dos canais de Ca^{++} , permitindo um estoque destes íons Ca^{++} para diminuir a concentração de gradiente no citoplasma, que tem sua concentração aumentada 10 vezes pela estimulação dos mAChR (BERRIDGE e IRVAINE, 1989 apud BAUM, 1993; TURNER, 1993).

1.4.3 NOMENCLATURAS

A proposta da nomenclatura glandular está em conformidade com aquela na *Nomina Anatomica* (1983, 5ª edição, p.A33) exceto que o inglês

está no lugar do latim. Esta proposta foi formulada por vários autores em conjunto (ATKISON et al., 1993).

1.4.3.1 Saliva total:

Fluido obtido da boca por expectoração.

1.4.3.2 Saliva parotídica:

Fluido secretado pela glândula parótida e obtido diretamente do orifício do ducto parotídeo.

1.4.3.3 Saliva submandibular:

Fluido secretado pela glândula submandibular e obtido diretamente do orifício do ducto submandibular.

1.4.3.4 Saliva submandibular/sublingual:

Fluido secretado principalmente das glândulas submandibular e sublingual e obtido do assoalho da boca, na vizinhança da abertura dos ductos submandibular, onde secreções das glândulas parótida e glândulas salivares menores são impedidas de terem acesso a essa região.

1.4.3.5 Secreções das glândulas salivares menores:

Fluido secretado pelas glândulas salivares menores obtido diretamente da abertura do ducto. A localização das glândulas deve ser indicada (e.g., labial, palatina, etc.) porque há diferenças nas secreções.

1.4.3.6 Fluido crevicular gengival:

Fluido que ganha acesso à cavidade oral via crevice gengival.

1.4.3.7 Fluido oral:

Fluido obtido pela inserção de absorventes coletores dentro da boca.

1.4.3.8 Saliva não-estimulada:

É a secreção basal; saliva secretada na ausência de estímulos gustatório, mastigatório, ou mecânico.

1.4.3.9 Saliva estimulada:

Saliva secretada em resposta a estímulos mecânicos, farmacológicos, ou gustatórios.

1.4.4 MÉTODOS DE COLETA DA SALIVA

A saliva estimulada tem fatores que a influenciam, tais como: exposição à luz, estímulo gustatório, estímulo mastigatório, estímulo olfatório, horário do dia (ciclo circadiano), posicionamento do corpo, grau de hidratação, estações do ano, medicamentos (estes são dependentes da composição e do fluxo), natureza do estímulo, duração do estímulo e tamanho das glândulas.

São definidos quatro métodos de coleta de saliva (NAVAZESH, 1993).

1.4.4.1 Método da drenagem:

Num tubo de pré-pesagem ou em um tubo graduado adequado com funil, coleta-se a saliva que pinga do semilábio menor. No final do período de coleta o sujeito expectora no tubo. O "Sialometer" de pró-fluxo é um recipiente de coleta graduado, acoplado a um funil, que pode realizar este tipo de coleta.

1.4.4.2 Método de cuspe:

Acumula-se a saliva no assoalho da boca e se cospe em um tubo de pré-pesagem ou graduado.

1.4.4.3 Método de sucção:

A saliva é continuamente aspirada do assoalho da boca em um tubo, por um ejetor ou um aspirador.

1.4.4.4 Método do bastão:

A saliva é coletada, através da absorção, por um bastão de pré-pesagem ou tufo de algodão ou gaze, sendo esses colocados nos orifícios das principais glândulas da boca, sendo removidos para repesagem no final do período de coleta.

1.4.5 INFLUENCIADORES SALIVARES

Há muitos influenciadores salivares e a base para eles é qualquer acontecimento que acometa diretamente a anatomia das glândulas ou a parte autônoma do organismo. Um exemplo é o da secreção salivar que pode ser prejudicada pelo tratamento com drogas anti-hipertensivas (NEDERFORS, et al., 1995).

Tabela - 3

FATORES QUE INFLUÊNCIAM NA COMPOSIÇÃO DA SALIVA TOTAL HUMANA
1. Contribuição proporcional das diferentes fontes glandular
2. Contribuição do sangue e fluido crevicular gengival
3. Qualidade da higiene oral
4. Composição do plasma
5. Taxa de fluxo
6. Natureza do estímulo
7. Duração do estímulo
8. Tempo de pós previa estimulação
9. Ritmos Circadiano e circannual
10. Polimorfismo genético
11. Estimulação antigênica
12. Exercícios
13. Drogas
14. Condições da parada de fluxo
15. Doenças variadas

Fonte: DAWES, 1993.

Tabela - 4

TABELA DE INSTRUÇÕES PRÉVIAS PARA COLETA DE SALIVA NO TESTE ERGOMÉTRICO				
Procedimento quanto ao material	Procedimento quanto ao local	Procedimentos quanto à pessoa		
Manter a saliva no gelo	A luminosidade e som devem ser padronizados.	Instruções Prévias (0,5 -2 horas antes)	Logo Antes da Coleta	Durante a coleta
Centrifugação prévia.	*A umidade do ar deve estar adequada.	Higiene Bucal Hidratação (Ingerir 400mL de H ₂ O)	Enxaguar a boca com H ₂ O destilada ou desionizada	Deve-se descartar toda saliva durante 10' de coleta
Tubos resfriados.	O cheiro do ambiente, deve ser sempre o mesmo.	Abster-se de: Cigarro Comida		Não deixar contaminar a saliva com suor
Congelar até a análise.	*A temperatura deve estar entre 21-25°C.	Bebida (café, Chá) Drogas (incluindo medicamentos simpatomiméticos)	Descartar a saliva dos primeiros 2'	Seguir as recomendações do teste de esteira.

Baseada em PANDAL, S., 1990 apud BODIS HAREGEWOIN, 1993; NAVAZESH, 1993; WILSON, 1993; CHATTERTO, 1996; SHIRTCLIFF, 2001; NEDERFORS e DAHLÖF, 1992; ERICSON e TWETMAN, 1995; MORRISON, et al., 2003.

Tabela - 5

DOENÇAS SISTÊMICAS QUE AFETAM GLÂNDULAS SALIVARES E SALIVA	
Síndrome de Sjögren	Disfunções hormonais
Doenças reumáticas	Diabetes
<i>Graft versus hoste disease</i>	Pancreatite
Sarcodiasas	Doença adreno-cortical
Fibrose cística	Tireoidite
Hipertensão	Acromegalia
Desnutrição	Paralisia Bell's
Paralisia cerebral	

Fonte: MANDEL, 1993.

1.4.6 PROBLEMAS CLÍNICOS NO QUAL A SALIVA CONTRIBUI PARA DIAGNÓSTICO

Baseado em Mandel (1990) e Gilbard (1978) fez-se uma lista de problemas clínicos na qual a saliva contribui para diagnóstico. São exemplos destes problemas: Toxidade digital (cálcio e potássio); Desordens afetivas (prostaglandina); Imunodeficiência (IgA secretório); Estomatites em quimioterapia (albumina); Uso de cigarro (cotinina); Câncer gástrico (Nitrato e Nitritos); Medicamento forense (substância de grupos sanguíneos); Doença celíaca (gliadina anti-IgA); Função do fígado (liberação de cafeína).

1.4.7 SALIVA, DROGAS E SEUS MENSURAMENTOS

Suposições precisas para nível de drogas na saliva, foram feitas por Wilson, (1993) que as elaborou com base em outros estudos (KOYSOOKO; ELLIS; LEVY, 1974; TROUPIN e FRIEL, 1975; DAVIS, 1943; SCHRAMMOL/L et al., 1991; SCHRAMMOL/L e SMITH 1991; MORNSTAND, 1986; VON KNORRING e MORNSTAND 1986; COUDERT, 1990).

- ✓ A droga e seus metabólitos são excretados na saliva.
- ✓ A maioria das drogas encontradas na saliva estão livres ou desligadas.
- ✓ O pH da saliva tem efeito mínimo.
- ✓ Existe concordância na concentração de drogas na saliva e no plasma e seus efeitos clínicos.
- ✓ A taxa de drogas da saliva/plasma é invariável em relação a doses simples, ao intervalo entre elas, e estima o estado estático.
- ✓ Parâmetros farmacocinéticos são similares àqueles do plasma.
- ✓ Idade, estado fisiológico ou estado de doença não fazem mudar a fração da droga não ligada no plasma nem a concentração na saliva.
- ✓ Outras drogas têm efeito mínimo na concentração de saliva.
- ✓ A droga é estável na saliva.
- ✓ Frações da saliva total contêm concentrações similares de drogas.

Tabela - 6

COMPONENTES MENSURADOS NA SALIVA	
Cortisol	Carbamazepina
Aldosterona	Teofilina
Testosterona	Cafeína
Progesterona	Lítio
Estrogênio	Metadona
Insulina	Maconha
Melatonina	Cocaína
Antipirina	Etanol
Feniton	Drogas hipertensivas

Fonte: Mandel (1990), NEDERFORS, T., DAHLÖF, C, ERICSON, T. E TWETMAN, S. (1995).

1.5 COMPONENTES SALIVARES ORGÂNICOS

1.5.1 PROTEÍNA TOTAL

É sugerido que há na saliva mais de 200 tipos de proteínas (MARSHALL, 1984 apud JENZANO et al., 1986). No trabalho de Rantonen e Meurman (2000), que avaliaram em 16 homens e 14 mulheres (média de idade 24,2 e 21,7 e desvio padrão 2,9 e 1,5 respectivamente) a variação de amilase, proteína total, imunoglobulinas, lisozima e albumina na saliva total estimulada durante o dia (08:00, 11:00, 14:00, 17:00 e 20:00 horas). Sugeriram que as variações da concentração na Imunoglobulina do tipo A (IgA), albumina, amilase e proteína total estão sujeitas a uma variação pequena. A proteína total foi correlacionada positivamente com a amilase salivar.

Sabe-se que a atividade simpática pode causar um grande aumento na secreção das proteínas salivares diretamente via impulso neural para as

glândulas salivares ou através das catecolaminas circulantes nos β -adrenoceptores. Um estudo evidenciou que um bloqueio nos β -adrenoceptores pode reduzir, significativamente, tanto a proteína total como a atividade da α -amilase (NEDERFORS e DAHLÖF, 1992).

As pesquisas de Walsh et al., (1999) tiveram como objetivo a avaliação do efeito do esforço agudo em um exercício intenso intermitente na concentração salivar da IgA, da atividade da alfa-amilase e da concentração proteína total. Constataram que a proteína total aumentou 3 vezes ($p < 0.01$), em relação ao basal, durante um exercício contínuo e retornou, 2,5 horas pós-exercício, a níveis de pré-exercício.

1.5.2 ALFA-AMILASE SALIVAR

A α -amilase humana (1,4- α -D-glicano glicanohidrolase; EC 3.2.1.1.) é monoméricas. São proteínas ligantes de cálcio, com uma única cadeia polipeptídica de 496 aminoácidos (RAGUNATH; SUNDAR; RAMASUBBU, 2000), que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,4 no amido e no glicogênio, havendo um grande número de isoenzimas (KELLER et al., 1971 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989; WALSH et al., 1999). As melhores condições de temperatura e pH para a atividade da alfa-amilase são respectivamente, 60°C e pH 6,5 (ÖZBEK e YÜCEER, 2001). A quantidade de amilase em relação à proteína total é de aproximadamente 10-70%. E a glândula parótida é responsável por 30% da produção total de proteínas salivares (MANDEL e ELLISON, 1965; BERNFELD, 1951 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989).

Duas famílias podem ser distinguidas: a família A que é glicosilada e tem um peso molecular de 62kD, e a família B que não é glicosilada e tem um peso molecular de 56kD (KAUFFMAN et al., 1970; KELLER et al., 1971 apud MINAGUCHI e BENNICK., 1989). Rahim e Yaacob (1992) detectaram por eletroforese a atividade de alfa-amilase na saliva total humana, revelando-se mais de 20 bandas de proteínas.

A amilase é sintetizada, não somente, por glândulas salivares, mas também pelo pâncreas. As duas amilases têm composições químicas muito similares e são imunologicamente indistinguíveis (STIEFEL e KELLER, 1973 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989), mas têm diferentes pontos isoelétricos, pesos moleculares e propriedades catalíticas (STIEFEL e KELLER 1973, 1975 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989). Foi demonstrado que a estrutura primária da amilase salivar e amilase pancreática, quando deduzida de uma seqüência de cDNA, são 94% homólogas (NAKAMURA et. Al., 1984 apud MINAGUCHI e BENNICK.,1989). Estes resultados indicam que diferentes genes codificam a amilase pancreática e a salivar. Isso tem suporte nos dados polimórficos de proteínas, os quais mostram que amilase salivar (Amy_1) e amilase pancreática (Amy_2) são de genes separados (MERRIT e KARN, 1977 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989). A estrutura e o lócus para a amilase humana são muito próximos, localizados no cromossomo 1 (ZABEL et al., 1983; TRICOLI e SHOWS, 1984 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989). Por gel de eletroforese de poliacrilamida foi demonstrada a presença de 11 tipos da amilase salivar (Amy_1) incluindo 10 alelos variantes (Amy_1B,C,D,E,F,G,H,I,J , e K) que são herdados co-dominantemente com um alelo comum (Amy_1A). (MERRIT e KARN, 1977 apud MINAGUCHI e BENNICK, 1989).

É sugerido que a amilase salivar seja um indicador da função das células acinares das glândulas salivares (MÄKINEN, 1984 apud JENZANO et al.,1986). No trabalho de Lenander-Lumikari et al., (2000) foi mencionado que a amilase é sintetizada principalmente em célula acinar e menos em célula proximal dos ductos intercalados. A amilase foi correlacionada negativamente com outras proteínas salivares e positivamente com o total de proteínas (RANTONEN e MEURMAN, 2000). Uma alta concentração de alfa-amilase é considerada o melhor indicador da secreção salivar evocada pela atividade adrenérgica (ANDERSON et al., 1984).

As concentrações da alfa-amilase salivar são predicativas de níveis plasmáticos de catecolaminas, particularmente NE, sob uma variedade de

condições de estresse. A alfa-amilase pode ser um marcador mais direto e mais simples para mensurar a atividade das catecolaminas do que o é o batimento cardíaco (CHATTERTON et al., 1996).

A amilase salivar foi utilizada também para a determinação do limiar anaeróbico (T_{sa}) pela análise de sua concentração na saliva total durante teste de exercício em laboratório. O T_{sa} foi determinado como "o ponto no qual o 1º aumento contínuo da amilase salivar ocorre durante o exercício". Foram usados 20 voluntários homens (idade 21+/- 3 anos; altura 176,1+/-6,4; peso 69,9 +/-8,6). Os voluntários faziam exercícios militares de 5 a 6 vezes por semana (corrida, treinamento de peso e treinamento militar). Eles passaram por um exame físico, assinaram um termo de consentimento e um contrato de declaração do American College of M. Sports. Eles fizeram dois testes em esteira, submáximo e máximo, que foram realizados das 9:00 às 11:00. No submáximo fizeram 5 minutos de aquecimento, com os estágios durando 3 minutos, onde a velocidade aumentava em 0,28m/s por estágio até a exaustão. A inclinação da esteira foi fixada a 1% para todo o estágio submáximo. Sendo a carga do 1º estágio individualmente determinada. O teste Máximo foi realizado após 80' da realização do teste submáximo para determinação do VO_2 . Foi utilizado analisador de gases (CPX, medical graphic). Coletaram a saliva: antes do aquecimento (cinco minutos de aquecimento) e nos últimos 30" de cada estágio. Deu-se água destilada antes de remover debris e hidratou-se os voluntários com 400mL de água 30min antes do teste. A saliva coletada foi diluída de 100-1000 vezes para a análise da amilase pelo método de Dahlquis (1962), a atividade da enzima foi dada por U/L (uma Unidade internacional é igual à quantidade de enzima gerando 1 μ mol de produto por minuto). A coleta do sangue foi feita furando-se um dedo da mão, retirando-se, com capilar, 25 μ L para análise do lactato. Os resultados obtidos foram: $r=0,95$ AT com T_{sa} expressado com o batimento cardíaco e outra de $r=0,93$ AT com T_{sa} expressado com a velocidade de corrida, 4 indivíduos foram descartados ficando um $n = 16$ (CALVO et al., 1997).

No ano seguinte o limiar salivar (T_{sa}) foi redefinido como sendo “o ponto durante o exercício, no qual os níveis da alfa-amilase salivar e eletrólitos (especialmente Na^+) também começam a aumentar acima dos níveis basais” (CHICHARRO et al., 1998).

Num estudo, realizado durante exercício físico intermitente de competição, constatou-se um aumento de cinco vezes na atividade da α -amilase ($p < 0.01$), com sua taxa de secreção sendo menor imediatamente no pré-exercício do que em qualquer outro instante. A explicação para isso pode ser um estresse fisiológico antecipado (WALSH et al., 1999).

O estresse leve pode reduzir a inibição de atenção seletiva. É discutido que com um aumento da alfa-amilase e com a correlação entre atenção e cortisol após o estresse, parece provável que o processo de atenção está sob um rigoroso controle do sistema cerebral, esse media a resposta de luta ou fuga (SKOSNIK et al., 2000).

A Saliva excretada em resposta à estimulação adrenérgica, geralmente, tem um alto conteúdo orgânico, incluindo elevados níveis de alfa-amilase comparada com a saliva excretada pela estimulação colinérgica (CHICHARRO et al., 1998).

1.5.3 LACTATO SALIVAR

O pH muscular e sangüíneo varia de 6,8-7,4 ou mais, assim 99% do ácido láctico que está presente no corpo esta na forma de lactato e íon hidrogênio, pois o ácido láctico possui o log negativo da constante de dissociação (pK) aproximadamente em 3,7. O lactato tem sido considerado um doador imediato de energia para contração muscular (através de sua reconversão a piruvato), é também fator primário da dor muscular. O débito de oxigênio é o agente causador da fadiga muscular. (ROWELL e SHEPHERD, 1996; McARDLE et al., 1996.)

Testou-se a hipótese de que a concentração de lactato na saliva possa refletir àquela presente no sangue e de que o lactato salivar possa ser usado como uma variável útil no estudo do metabolismo anaeróbico. A determinação

de lactato foi feita pelo método eletroenzimático, usando-se 25µL de amostra de ambos fluidos. Resultados para cada situação: a concentração de lactato na saliva mostrou-se ser 15% a mais do que no plasma, sendo seguido a amostra padrão durante o exercício teste. Uma boa correlação ($r=0.81$) entre lactato sangüíneo e salivar foi encontrada. O lactato aparenta ser bem estável sob um período de quarenta dias após a coleta, quando mantido por 4°C. Assim, a determinação de lactato na saliva pode ser usada como uma alternativa para sua detecção no sangue, superando o maior dos inconvenientes dos procedimentos usados até o momento, pois a coleta das amostras não requereu atenção especial (SEGURA et al., 1996).

Foi demonstrado que a Lactato desidrogenase (LDH) salivar humana é uma enzima ubíqua com significativa função no diagnóstico clínico de processos patológicos. A saliva total em contraste com o plasma contém íons de metal ativados-redox, tais como ferro e cobre que podem aumentar a perda da atividade da LDH. Concluí-se que a saliva total na presença de fumaça de cigarro torna-se um potente agente modificante de proteína que pode destruir alguns dos seus componentes endógenos (NAGLER et al., 2001).

Também foi estudado o efeito do exercício sobre os níveis de eletrólitos e de cortisol. O teste consistia na execução de uma série de exercícios submáximo por nove minutos, até um pico de 85% de seu batimento cardíaco predito pela idade. Registrou-se um significativo aumento de níveis séricos de Na^+ , K^+ , e lactato salivar imediatamente após o exercício. Nível reduzido de fluxo salivar e elevados níveis de K^+ , proteína, e lactato foram observados 10 minutos após o exercício (BEM-ARYEH et al., 1989).

1.6 COMPONENTES SALIVARES INORGÂNICOS

1.6.1 ÓXIDO NÍTRICO

1.6.1.1 Introdução

Nos últimos anos tem-se pesquisado muito o "óxido nítrico" (NO). Todas as principais isoformas do óxido nítrico sintase (NOS), incluindo um splice variante de músculo-específico e de um tipo neuronal (n) da NOS, são

de lactato foi feita pelo método eletroenzimático, usando-se 25µL de amostra de ambos fluidos. Resultados para cada situação: a concentração de lactato na saliva mostrou-se ser 15% a mais do que no plasma, sendo seguido a amostra padrão durante o exercício teste. Uma boa correlação ($r=0.81$) entre lactato sanguíneo e salivar foi encontrada. O lactato aparenta ser bem estável sob um período de quarenta dias após a coleta, quando mantido por 4°C. Assim, a determinação de lactato na saliva pode ser usada como uma alternativa para sua detecção no sangue, superando o maior dos inconvenientes dos procedimentos usados até o momento, pois a coleta das amostras não requereu atenção especial (SEGURA et al., 1996).

Foi demonstrado que a Lactato desidrogenase (LDH) salivar humana é uma enzima ubíqua com significativa função no diagnóstico clínico de processos patológicos. A saliva total em contraste com o plasma contém íons de metal ativados-redox, tais como ferro e cobre que podem aumentar a perda da atividade da LDH. Concluí-se que a saliva total na presença de fumaça de cigarro torna-se um potente agente modificante de proteína que pode destruir alguns dos seus componentes endógenos (NAGLER et al., 2001).

Também foi estudado o efeito do exercício sobre os níveis de eletrólitos e de cortisol. O teste consistia na execução de uma série de exercícios submáximo por nove minutos, até um pico de 85% de seu batimento cardíaco predito pela idade. Registrou-se um significativo aumento de níveis séricos de Na^+ , K^+ , e lactato salivar imediatamente após o exercício. Nível reduzido de fluxo salivar e elevados níveis de K^+ , proteína, e lactato foram observados 10 minutos após o exercício (BEM-ARYEH et al., 1989).

1.6 COMPONENTES SALIVARES INORGÂNICOS

1.6.1 ÓXIDO NÍTRICO

1.6.1.1 Introdução

Nos últimos anos tem-se pesquisado muito o “óxido nítrico” (NO). Todas as principais isoformas do óxido nítrico sintase (NOS), incluindo um splice variante de músculo-específico e de um tipo neuronal (n) da NOS, são

expressados nos músculos do esqueleto de todos os mamíferos. Expressão e localização de isoformas da NOS são dependentes da idade, fase de desenvolvimento, da inervação, da atividade, da história da exposição a citocinas, do fator de crescimento e do tipo de fibra de músculo e espécies (STAMLER et al., 2001).

Tabela – 7.

METABÓLITOS OXIDADOS DO NITROGÊNIO		
Símbolo	Nome	Comentário
NO [•]	Óxido Nítrico	Radical livre
NO [•] ₂	Dióxido de Nitrogênio	Radical livre, agente nitrante e oxidante.
N ₂ O	Óxido Nitroso	Anestésico
N ₂ O ₃	Trióxido de Dinitrogênio	Agente nitrositio, oxidante
N ₂ O ₄	Tetraóxido de Dinitrogênio	Dímero de NO [•] ₂ ; Agente nitrositio;
NO ₂ ⁻	Nitrito	Produz NO [•] em pH ácido.
NO ₃ ⁻	Nitrato	Ânion estável

Fonte: CONNER. e GRISHAM, 1995.

O nNOS podem mostrar uma predominância particular no músculo de contração rápida. A localização e atividade da NOS nos músculos são reguladas por várias interações proteína-proteína e modificações co- e/ou pós-translacional. A compartimentalização subcelular das NOS habilita distintas funções que são mediadas por aumentos em cGMP e por S-nitrosilação de proteínas como o canal de liberação de receptor-cálcio de rianodina . Funções do músculo do esqueleto reguladas por NO ou moléculas relacionadas, incluem produção de força (que junta excitação-contração), autoregulação de fluxo sanguíneo, diferenciação de miócito, respiração, e homeostasia de glicose. Destes estudos provêm novas percepções com aspectos fundamentais de fisiologia de músculo, de célula, de biologia, de fisiologia de canal de íon, de homeostase de cálcio, de sinal de transdução, e da

bioquímica dos sistema de redox-relacionado (STAMLER et al., 2001). O NO reage facilmente com a molécula de oxigênio formando compostos mais estáveis, tais como, nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (MARLETTA, M.A., 1988).

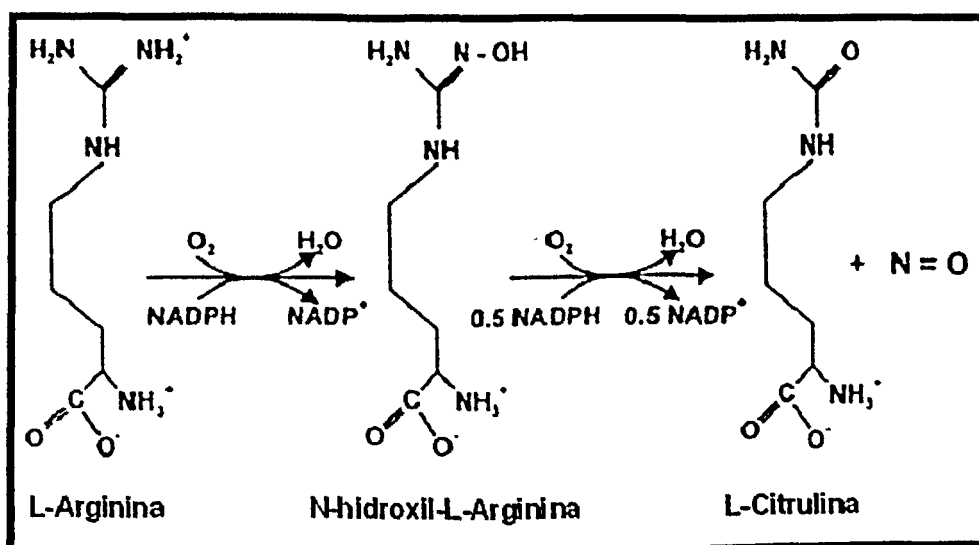
1.6.1.2 Nomenclatura

As enzima óxido nítrico sintetase (NOSs) é o produto de três genes (NATHAN e XIE, 1994.; GASTON e STAMLER, 1999 apud STAMLER et al., 2001). Esses são nomeados, depois das células ou sistemas dos quais eles foram purificados, originalmente em ordem de descoberta, sendo assim designados: neuronal (n) NOS (NOS1), macrófagócito (imune)/cálcio calmodulina-independente ou "indizíveis" (i) NOS (NOS2) e endotelial (e) NOS (NOS3). A designação numérica está em concordância com a recente avaliação que cada uma das NOSs tem sua distribuição nos tecido. No entanto, a classificação de NOSs como "constitutivo" ou "indizível" se mostrou ser incerto, porque cada uma das isoformas podem ser reguladas dinamicamente. A inducibilidade é uma função de maior taxa de estímulo do que o produto de gene. Fatores de splicing alternativo são importantes no padrão de expressão de NOS. Em particular, nNOS em maturação no músculo esquelético e no cardíaco contém um 34-amino ácido suplementares que surge do splicing alternativo de pré-RNA do nNOS entre os éxons 16 e 17 (SILVAGN; XIA; BREDET, 1996; BRENMAN et al., 1997 apud STAMLER et al., 2001). A isoforma do músculo é chamada de nNOSm. Três cDNAs distintos, (de éxon 1 variante) surge de promotores alternativos de um único gene de nNOS, são vigorosamente expressados no músculo esquelético (WANG et al., 1999 apud STAMLER et al., 2001).

1.6.1.3 Atividade Óxido Nítrico relacionada

Todos as três NOSs compartilham um esquema catalítico semelhante dentro do qual o aminoácido L-arginina é transformado em uma variedade de óxido nítrico (moléculas NO). O termo NO é assim usado em um senso genérico ou coletivo (STAMLER, 1999).

Figura – 6. Formação do NO.



As moléculas mais próximas que se identificam com a atividade do NO incluem: ele mesmo (NO), S-nitrosotióis (SNOs), complexos metal-NO e os maiores óxidos de nitrogênio (NOx incluindo peroxinitrito) (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992 apud STAMLER et al., 2001). A nNOS também pode produzir um íon de nitroxil (SCHMIDT et al., 1996; STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992 apud STAMLER et al., 2001). Todas as NOSs geram NO, SNO, e provavelmente quantidades pequenas de peroxinitrito (NO/O₂) (STAMLER, 1999). Há uma boa razão para se acreditar que a disponibilidade de co-fatores e co-substratos como também a localização subcelular podem influenciar na identidade do produto enzimático (STAMLER et al., 1997 apud STAMLER et al., 2001).

1.6.1.4 Saliva, NO e Exercício Físico

O Óxido nítrico (na forma de nitrato e nitrito) pode ser encontrado na saliva refletindo sua concentração no sangue, essa aumenta durante o exercício físico prolongado (PANOSSIAN et al., 1999).

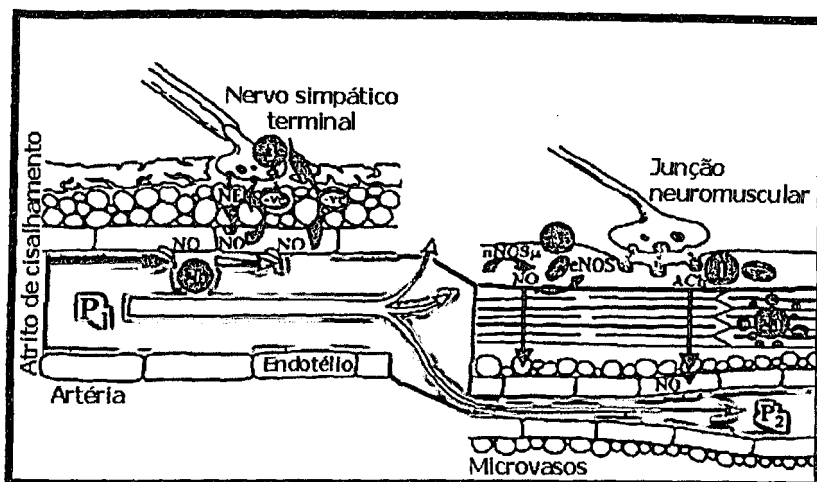
Os mecanismos controladores do fluxo sanguíneo no músculo esquelético, durante o exercício, são complexos e envolvem um controle neural, metabólico, endotelial, miogênico e da bomba muscular. Este mecanismo modula o fluxo salivar via efeito na pressão de perfusão e no

calibre da resistência dos vasos. Tradicionalmente o calibre dos vasos sugere um balanço, diretamente mediado pela vasodilatação e pela produção de metabólitos, do músculo em exercício e ativação simpática via estimulação metabólica e mecanorreceptores. O NO deriva tanto do endotélio (NOS endotelial do tipo III) como do músculo esquelético (NOS neuronal, tipo I), podendo assim, desenvolver um importante papel na manutenção da perfusão tecidual demandada (KINGWELL, 2000).

Os mecanismos causadores da hiperemia induzida pelo exercício físico, através da produção de NO no endotélio dos vasos, são dois: (1º) O "shear stress" (atrito de cisalhamento) vascular que é determinado pelo fluxo e pela viscosidade sangüínea, e é agora um estímulo bem estabelecido para o aumento do nível de Ca^{++} e liberação do NO no endotélio vascular. Então o NO se difunde para as subjacências das células do músculo liso vascular, onde ativa a guanilato ciclase para a produção de cGMP a partir de GTP e, finalmente, a vasodilatação (SEGAL, 1994). Assim, a dilatação de microvasos, em resposta a acumulação de metabólitos vasodilatadores, cria um gradiente de pressão que estimula a dilatação do fluxo mediado da circulação arterial pela indução do "shear stress", ocorrendo então a liberação de NO do endotélio (SEGAL, 1994). É interessante ressaltar que a força de cisalhamento é aumentada nos vasos durante o exercício físico em humanos (TAYLOR et al., 2002). (2º) Através da liberação de acetilcolina da junção neuromuscular, que pode difundir-se para o endotélio vascular, ativando os receptores muscarínicos liberando assim NO (KINGWELL, 2000).

Estes dois mecanismos podem ser melhor entendidos na figura 7, que é uma representação esquemática da nutrição das artérias (esquerda) e microvasos (direita) ilustrando o potencial do mecanismo do NO mediando a hiperemia exercício induzido.

Figura – 7. Mecanismos de liberação do NO no endotélio dos vasos



Fonte: KINGWELL, 2000.

Em relação a figura 7: 1) A Acetilcolina (ACh) da junção neuromuscular pode difundir-se para o endotélio vascular onde ativa os receptores (triângulo cinza invertido), promovendo a liberação do NO, relaxamento local das células do músculo liso e a dilatação conduzida via hiperpolarização das células endoteliais. 2) A acetilcolina ativa acumulação de metabólitos no músculo contrátil (2a). A dilatação induzida nos microvasos promove um gradiente de pressão ($P_1 > P_2$), com circulação em resposta das artérias. O resultante aumento do fluxo eleva o atrito de cisalhamento e libera o NO endotelial derivado. (2b) Embora o preciso mecanismo de transdução de sinal da acetilcolina não esteja ainda bem determinado. 3) O sistema nervoso central e o ergoreflexo-gerado elevam a atividade simpática para promoverem a resposta das artérias. A liberação de NO, via estimulação dos α -2-receptores endoteliais (trapezóide cinza). O NO pode também inibir a calibração, pré-juncional, de noraepinefrina (NE) e constricção mediada por α -2 no músculo liso vascular. 4) O NO originado do músculo esquelético (nNOSm), possivelmente produzido em resposta à contração-induzida pela elevação do cálcio intracelular, pode também se difundir nas arteríolas do músculo liso e promover a vasodilatação (KINGWELL, 2000).

Foi evidenciado que a força de cisalhamento, acentuado pela viscosidade de perfusão, aumentou a condutância vascular renal basal pelo

mecanismo NO-dependente. Com o aumento da força de cisalhamento durante a vasoconstrição nos rins, ocorre redução da vasopressina induzida (LOICHOT et al., 2002). Durante o exercício intenso, com o aumento da frequência cardíaca e da viscosidade do sangue, tem-se um aumento do atrito na parede dos capilares. (CAILLAUD et al., 2002)

Segundo CLARK et al., (1998) há dois tipos de vasoconstrição: a do tipo "A" e a do "B". O tipo A e B aumentam a pressão de perfusão para chegar mais sangue nos vasos. No entanto, somente a do tipo A causa um aumento adicional da entrega do sangue (NEWMAN et al., 1996). Este tipo A é chamado assim porque, pois concomitante com sua atividade vasoconstrictora, aumenta uma variedade de trocas metabólicas, incluindo produção de oxigênio, efluxo de lactato, de glicerol, de urato e de uracil, tal como, produção de glicose insulina-mediada. A vasoconstrição do tipo A inicia-se quando o Ca^{++} não se encontra na perfusão média ou quando o O_2 é substituído por N_2 . Além disso, os vasodilatadores que liberam o NO bloqueiam os canais de Ca^{++} ou levam à produção do AMP cíclico na vasculatura do músculo liso. O NO bloqueia tanto a atividade vasoconstrictora como a metabólica. Assim, se caracteriza por uma proporcionalidade entre vasoconstrição e aumento do metabolismo. O tipo B difere do tipo A, dado que pode iniciar-se com baixas quantidades de Ca^{++} ou quando o O_2 é substituído por N_2 durante a perfusão dos membros. A vasoconstrição do tipo B reduz uma variedade de trocas metabólicas, além, de não ser bloqueadas pela adição de vasodilatadores. Mas os dois tipos aumentam a perfusão no músculo em repouso (CLARK et al., 1998).

As evidências de que o NO é um importante regulador hemodinâmico e metabólico, durante a atividade física, são cada vez mais nítidas (BALON e NADLER, 1994). Panossian, et al., (1999) realizaram uma pesquisa em exercício físico e verificaram um aumento, no sangue e na saliva, do conteúdo do óxido nítrico e cortisol. Eles também investigaram o uso de raízes e de fito-ervas *Schizandra chinensis* e *brionia alba* administradas em diferentes grupos de atletas. Estes extratos aumentaram a concentração de óxido nítrico (NO) e

de cortisol, no sangue e na saliva, de maneira semelhante a que ocorria em atletas submetidos a exercício físico intenso. Estes resultados estão relacionados com um aumento da performance física em atletas com adaptogens verso atletas com placebo. Após o tratamento, em atletas em exercício físico pesado, com adaptogen não houve um aumento nem do NO salivar e nem do cortisol. Já os atletas tratados com placebo, no exercício físico pesado, tiveram o NO salivar aumentado. Em exercício físico pesado o NO aumentou no sangue e na saliva. O NO salivar pode ser utilizado tanto na avaliação da carga física quanto no efeito protetor contra o estresse de um adaptogen.

Salvolini et al., (2000) realizaram um estudo bioquímico da saliva não-estimulada e perceberam que em relação a idade e o envelhecimento das pessoas. Achados, relativos à saliva total humana não estimulada, mostraram um aumento significativo na produção de NO em idosos, sugerindo que esse aumento poderia depender de uma estimulação dos leucócitos induzíveis pela atividade da NO sintase (i-NOS). Ainda, sugeriu que, durante o envelhecimento, os tecidos orais podem ficar mais suscetíveis a fatores ambientais devido a uma modificação no equilíbrio entre agentes antimicrobiais diferentes.

A via da L-arg/NO desenvolve um papel modulador no controle colinérgico, tanto do fluido salivar como na secreção da amilase, mas não na produção de EGF. A L-arg não é um fator limitante na regulação. O mecanismo de ação do NO precisa ser identificado com a consciência de que pode envolver a inibição do mecanismo dos secretagogos, não identificados até o presente e que precisam ser caracterizados em estudos posteriores. Além disso, é sugerido que uma intencional resposta secretória em ratos, quando da estimulação de receptores muscarínicos, depende da fisiológica estimulação dos β -adrenorreceptores (LOHINAI et al., 1999).

A localização neural, em ratos e em porcos, da NOS sugere que o NO pode participar na regulação tanto do fluxo sangüíneo quanto da secreção das glândulas salivares. Sabe-se que o NO controla o "tônus vascular" nas

glândulas salivares em descanso, e o nervo autônomo após estimulação. (SCHACHTER e MATTHEWS, 1992, EDWARDS e GARRTTE, 1993; KEREZOUZIS et. al., 1993; MODIN, et al., 1994; FAZENKAS et al., 1994; LOHINAI et al., 1994; LOHINAI. et al., 1996; apud LOHINAI et al., 1999).

O efeito modulatório da secreção de fluido e amilase salivar pode envolver a supressão da atividade simpática, pois a vasoconstricção periférica inibida pelo NO é um importante elemento de controle da vasodilatação em vivo. (ZANZINGER; CZACHUSRSKI; SELLER, 1994). Inibindo-se a NOS, em ratos (fêmeas adultas normais), notou-se que houve uma diminuição da secreção salivar estimulada, indicando que o NO exerce um papel estimulatório na secreção salivar (RETTORI et al., 2000).

Há evidências da liberação de NO em saliva humana e do importante papel fisiológico que ele pode realizar, tanto na propriedade antibacteriana quanto na desintoxicação de carcinógenos orais (BODIS e HAREGEWOIN, 1993).

Recentemente foi mostrado que num exercício, de 45min até a exaustão, em ratos tanto a atividade NOS endotelial como a neuronal aumentaram (ROBERTS et al., 1999).

Lau et al., (1998) encontraram que no músculo extensor digital longo o conteúdo de cGMP aumentou em 250% com a estimulação elétrica, e que este aumento não ocorreu nas fibras mais rápidas do camundongo (*mdx*), já que essas são deficientes em nNOS, pois sabe-se que os doadores de NO aumentam a síntese de cGMP (ABRAHAM et al., 1998; KOBZIK, et al., 1994).

A atividade da NOS inibiu a respiração mitocondrial no músculo esquelético (KING et al., 1994; KOBZIK et al., 1995). Além disso, o NO pode influenciar na respiração celular ou na homeostasia do cálcio (STAMLER e MEISSNER, 2001).

O tratamento do músculo com fornecimento de NO pode inibir a atividade da actomiosina ATPase e, portanto, reduzir a força do músculo esquelético (PERKINS et al., 1997). No entanto, é difícil imaginar como as

concentrações de NO ou SNO podem ativar esse efeito (STAMLER e MEISSNER, 2001).

Mostrou-se, em experimentos realizados em cães, que há uma continuidade na vasoconstricção do músculo esquelético durante o exercício, que é mediada pelos receptores adrenérgicos α -1 e α -2. Com o aumento da intensidade de exercício ocorre uma proporcional diminuição da vasoconstricção (BUCKWATER e CLIFFORD, 1999).

1.6.2 SALIVA E ELETRÓLITOS

Como já mencionado no tópico 2.1.2, Chicharro et al., (1994), determinaram o limiar anaeróbico por análise da mudança da composição da saliva durante exercício cicloergométrico com incremento de cargas. Foram utilizados 13 homens com idade média de 23,1 anos e com desvio padrão de 3,3 anos, com altura média de 177 centímetros e com desvio padrão de 6,7, com média de peso de 73,4 e desvio padrão de 6,5 Kg. Realizou-se um teste submáximo, iniciado com 50W (Watts) e aumentado, a cada 3 minutos, em 50W até o lactato sangüíneo exceder 4mmol/L. Um teste máximo de determinação da produção de O_2 (VO_2), iniciando com 100W e aumentando, a cada 2 minutos 50W foi realizado. As amostras de saliva e sangue foram obtidas somente no teste submáximo. O limiar de saliva (Th_{sa}) foi definido como, *"o ponto no qual houve o 1º aumento contínuo em um dos íons, (Cl , Na^+ ou K^+) durante o exercício"*. O Limiar de catecolaminas (Th_{ca}) foi definido como *"o ponto no qual um aumento não linear ocorreu em um deles, nora-adrenalina ou adrenalina"*. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o Th_{sa} e os outros métodos de identificação. Uma alta correlação foi encontrada entre o Th_{sa} e limiar de lactato sangüíneo (Th_{la}) ($r = 0,82$, $P < 0,01$) e Th_{sa} e Th_{ca} ($r = 0,75$, $P < 0,05$).

Em Chicharro et al., (1998) redefiniram o " T_{sa} " como sendo *"o ponto, durante o exercício, no qual os níveis da alfa-amilase salivar e eletrólitos (especialmente Na^+) também começam a aumentar acima dos níveis basais"*.

Chicharro et al., (1999) tiveram como objetivo conhecer porque o exercício pode causar mudanças na concentração de componentes salivares, tais como amilase, Na, e Cl. Amostras de concentrações de Fe, Mg, Sc, Cr, Mn, Co, Cu, Zn, Se, Sr, Ag, Sb, Cs, e Hg foram determinadas por espectrometria de massa de plasma. Já as concentrações de Ca e Na foram determinadas por espectrometria de absorção atômica. Concluíram que o exercício físico intenso induz mudanças nas concentrações de somente três (Na, Mg e Mn) dos dezesseis elementos analisados em amostra de saliva.

Ljungberg et al., (1997) analisaram as mudanças na saliva e soro após exercício extenuante prolongado. A concentração salivar de cloreto, fosfato e potássio são significativamente maiores após que antes da corrida. Concluíram que houve em várias mudanças na composição da saliva logo após a maratona, mas muitos dos valores retornaram à linha basal após uma hora de descanso. No entanto, os valores de sódio, cálcio, fosfato, peroxidase salivar, amilase e IgA salivares estiveram ainda elevados uma hora após a corrida.

Czegeny et al., (2001) relatam em seu artigo a homogeneidade e estabilidade de amostras de saliva tratadas e armazenadas em diferentes condições. Os produtos escolhidos para esta avaliação foram Na, Ca e Mg como elementos menores e Mn como elemento traço. Os resultados obtidos mostraram que quando a amostra foi homogeneizada em uma ultrabanheira, foi requerido um mínimo de 25mL de volume para se considerar essa amostra. A estabilidade dos analisados depende da sua própria concentração. Os conteúdos de Ca e Mg pareceram ser estáveis por menos de uma semana, quando as amostras foram estocadas em temperatura ambiente, e o conteúdo de Mn pareceu ser instável por um dia, mesmo quando as amostras foram congeladas em $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.7 CONCLUSÃO

Portanto, mostramos que a capacidade física tem várias formas de ser avaliada. Uma das formas que vem se sobressaindo é a avaliação de biomarcadores salivares para o monitoramento. Isso se deve às várias vantagens da saliva em relação a outros fluidos corporais, tendo como a

principal, a não invasão do corpo para ser coletada. Assim, sugere-se o uso da saliva, através de seus biomarcadores, não só para o monitoramento do estado fisiológico normal ou patológico do organismo e sim para a verificação do estado fisiológico do organismo quando submetido a exercício físico sendo este o objetivo principal desta dissertação.

1.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, R.Z.; KOBZIG, L.; MOODY, M.R.; REID, M.B.; STAMLER, J.S. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. **Comp Biochem Physiol A Physiol.** v.119, p.177-183, 1998.
2. ANDERSON, L. C.; GARRETT, J. R.; JOHNSON, D. A.; KAUFFMAN, D. L.; KELLER, P.J.; THULIN, A. Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. **J. Physiol.** v.352, p.163-171, 1984.
3. Annals of the New York Academy of Science. **Guidelines for saliva nomenclature and collection**, New York, v.694, p.xi-xii. Sept.1993. Número especial.
4. ATKISON, J. C.; DAWES, C.; ERICSON, T.; FOX, P. C.; GANDARA, B. K.; MALAMUD, D.; MENDEL, I. D.; NAVAZESH, M.; TABAK L. A. Guidelines for saliva nomenclature and collection. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.xi-xii, Sept.1993. Número especial.
5. ATSUMI, T.; IWAKURA, I.; KASHIWAGI, Y.; FUJISAWA, S.; UEHA, T.; Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. **Antioxid Redox Signal.** v.1, nº4, p.537-46, Winter,1999.
6. AZEN, E. A.; MAEDA, N.; Molecular genetics of human salivary proteins and their polymorphisms. **Adv. Hum. Genet.** v.17,p.141-199, 1988.
7. BALON, T.; NADLER, J. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. **J. Appl. Physiol.** v.77, p.2519-2521, 1994.
8. BANDERAS, T.J.A.; GONZALEZ, B.M. Genetic salivary protein polymorphism in Mexican population. **Bol Estud Med Biol.** v.44, nº1-4, p.19-23, Jan-Dec, 1996.
9. BANK, R.A.; HETTEMA, E.H.; ARWERT, F.; AMERONGEN, A.V.; PRONK, J.C. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase. **Electrophoresis.** v.12, nº1, p.74-9, Jan, 1991.
10. BARDON, A.; CEDER, O.; KOLLBERG, H. Cystic fibrosis-like changes in saliva of healthy persons subjected to anaerobic exercise. **Clin Chim Acta.** v.133, nº3, p.311-316, Oct, 1983.
11. BAUM, B.J. Neurotransmitter control of secretion. **J. Dent. Res.** v.66, p.628-632, 1987.

12. BAUM, B.J. Principle of saliva secretion. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.17-23. Sept.1993. Número especial.
 13. BEN-ARYEH, H.; ROLL, N.; LAHAV, M.; DLIN, R.; HANNE-PAPARO, N.; SZARGEL, R.; SHEIN-ORR, C.; LAUFER, D. Effect of exercise on salivary composition and cortisol in serum and saliva in man. **J Dent Res**. v.68, nº11, p.1495-1497, Nov,1989.
 14. BISHOP, N. C.; BLANNIN, A. K.; ARMSTRONG, E.; RICKMAN, M.; GLEESON, M. Carbohydrate and fluid intake affect the saliva flow rate and IgA response to cycling. **Med. Sci. Sports Exerc**. v. 32, n.12, p. 2046–2051, 2000.
 15. BLANNIN, A.K.; ROBSON, P.J.; WALSH, N.P.; CLARK, A.M.; GLENNON, L.; GLEESON, M. The effect of exercising to exhaustion at different intensities on saliva immol/Lunoglobulin A, protein and electrolyte secretion. **Int J Sports Med**. v.19, nº8, p.547-552, Nov,1998.
 16. BOBEK, L. A.; TSAI, H.; BIESBROCK, A. R.; LEVINE, M. J. **J. Biol. Chem**. v.268, p.20563–20569,1993.
 17. BODIS, S.; HAREGEWOIN, A. Evidence for the release and possible neuronal regulation of nitric oxide in human saliva. **Biochemical and biophysical research commol/Lunications**. Massachusetts, v.194, n.1, p.347-350, Jul, 1993.
 18. BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Biding. **Protein Assay By Dye Biding**. p.248-54, Jan, 1976.
 19. BRADLEY, S.; KINGWELL, B.; McCONNELL, G. Nitric oxide sintetase inhibition reduce leg glucose uptake, but not blood flow during dinamic exercise in humans, **Diabetes**, v.48, p.1815-1821, 1999.
 20. BUCKWATER, J.B.; CLIFFORD, P.S. α -adrenergic vasoconstrictiON IN active skeletal muscle during dynamic exercise. **Am J. physil**. v.277, p.H33-H39, 1999.
 21. CAILLAUD, C.; CONNES, P.; BOUIX, D.; MERCIER, J.; Does haemorheology explain the paradox of hypoxemia during exercise in elite athletes or thoroughbred horses? **Clin Hemorheol Microcirc**, v.26, nº3, p.175-81, 2002.- Resumo disponível na base de dados MedLine, 1966-2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em Jan, 2003.
 22. CALVO, F.; CHICHARRO, J.L.; BANDRÉS, F.; LUCÍA, A. PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L.L.; VAQUERO, A .F.; LEGIDO, J.C. (). Anaerobic threshold determinatin with analysis of salivary amilasy. **Can. J. Appl. Physis**. v.22, nº6, p.553-561, 1997.
-

23. CARPENTER, G.H.; PROCTOR, G.B.; PANKHURST, C.L.; O'DONOHUE, J.; SCOTT, D.; HUNNABLE, M.P.; Sialochemical markers of salivary gland involvement with Sjogren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis and primary biliary cirrhosis. **J Oral Pathol Med.** v.29, n°9, p.452-459, Oct, 2000.
 24. CHATOO, A.H.; LEE, V.M.; LINDEN, R.W.A. Evidence for synergism between the masticatory and gustatory parotid salivary reflex in human. **J Physiology.** v.459, p.34, 1993.
 25. CHATTERTON, R.T. Jr; VOGELSONG, K.M.; LU, Y.C.; ELLMAN, A.B.; HUDGENS, G.A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. **Clin Physiol.** v.16, n°4, p.433-48, Jul, 1996.
 26. CHATTERTON, R.T., Jr.; VOGELSONG, K.M.; LU, Y.C.; HUDGENS, A.A. Hormonal Responses to Psychological Stress in Men Preparing for Skydiving, **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** v.82, n. 8, p.2503-2509, 1997.
 27. CHICHARRO, J.L.; LUCIA, A.; PEREZ, M.; VAQUERO, A.F.; URENA, R. Saliva composition and exercise. **Sports Med.** v.26, n°1, p.17-27, Jul, 1998.
 28. CHICHARRO, J.L.; PEREZ, M.; CARVAJAL, A.; BANDRES, F.; LUCIA, A. The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise. **Jpn J Physiol.** v.49, n°6, p.551-554, Dec, 1999.
 29. CHICHARRO, J.L.; SERRANO, V.; URENA, R.; GUTIERREZ, A.M.; CARVAJAL, A.; FERNANDEZ-HERNANDO, P.; LUCIA, A. Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise. **Br J Sports Med.** v.33, n°3, p.204-207, Jun, 1999.
 30. CHICHARRO, J.L.; LEGIDO, J.C.; ALVARES, J.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; GAMELLA, C. Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. **Kur- J. Appl Phys. Madrid,** v.68, p.214-218, Dec, 1994.
 31. CHMURA, J.; NAZAR, K.; KACIUBA-USCILKO, H. Choice reaction time during graded exercise in relation to blood lactate and plasma catecholamine thresholds. **International Journal of Sports Medicine.** V.15, p.172-176, May, 1994.
 32. CLARK, M.G.; RATTIGAN, S.; DORA, K.A.; NEWMAN, J.M.B.; VINCENT, M.A. Biochemistry of exercise. **Human Kinetics,** Sydney. p.35-46, 1998.
 33. CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Nitric Oxide: Biochemistry, Physiology and Pathophysiology. **Methods: A Comp. Meth. in Enzim.** California, v.7, p.3-13, Feb, 1995.
-

34. CUCINELL, S.A.; WAN, S.; O'BRIEN, J.; WADE, C. Amylase excretion after exercise. **Am J Gastroenterol.** v.79, n°8, p.619-622, Aug, 1984.
 35. CZEGENY, Z.S.; CHICHARRO, J.L.; FERNANDEZ, P.; GUTIERREZ, A.; CAMARA, C. Homogeneity and stability studies on sodium, calcium, magnesium, and manganese in human saliva. **Biol Trace Elem Res.** v.79, n°2, p.131-7, Feb, 2001.
 36. DAVENPORT, H.W. Salivary secretion. Davenport, H.W., editor. **Physiology of the digestive tract.** 5^a, ed., Chicago, Year Book, Medical Publishers, p.103-112, 1992.
 37. DAVIS, J.A. et al., Anaerobic threshold and maximal aerobic power for three modes of exercise. **Jornal Applied Phisyology**, v.41, p544-550, 1976.
 38. DAWES, C. Consideration in the development of diagnostic tests on saliva. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.265-269, Sept, 1993. Número especial.
 39. DAWES, C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. **J Physiol.** v.320, p.139-48, Nov, 1981.
 40. DAWES, C.; MacPHEASON, L.D.M. Effects of nine different chewing-gums and lozenges on salivary flow rate and pH. **Caries Res.** v.26, p.176-182, 1992.
 41. DENNISS, A.R.; YOUN, J.A. Modufication of salivary duct eletrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. **Pflügers Arch.** v.376, p.73-80, 1978.
 42. DODDS, M.W.; YEH, C.K.; JOHNSON, D.A. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. **Commol/Lunity Dent Oral Epidemiol.** v.28, n°5, p.373-381, Oct, 2000.
 43. DONG, C.; PUCKETT, A.D. Jr.; DAWES, C. The effectts of chewing frequency and duration of gum chewing on salivary flow rate and sucrose concentration. **Arch Oral Biol.** v.40, p.585-588, 1995.
 44. DRZYMALA, L.; CASTLE, A.; CHEUNG, J.C.; BENNICK, A. Cellular phosphorylation of an acidic proline-rich protein, PRP1, a secreted salivary phosphoprotein. **Biochemistry.** v.29-39, n°8, 2023-2031, Feb, 2000.
 45. DUCLOS, M.; CORCUFF, J.B.; RUFFIE, A.; ROGER, P.; MANIER, G. Rapid leptin decrease in immol/Lediate post-exercise recovery. **Clin Endocrinol. Oxf,** v.50, n°3, p.337-342, Mar, 1999.
 46. ETZEL, K.R.; HEMPEL, J.D.; KOEPESEL, R.R. Identification of zinc proteins in rat parotid saliva. **Arch Oral Biol.** v.42, n°2, p.173-179, Feb, 1997.
-

47. FERREIRA, A.B.H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**, 2ª edição, 10ª Impressão, Nova fronteira, Rio de Janeiro. RJ. 1986.
48. FILAIRE E, L.A.C.G. Dehydroepiandrosterone (DHEA) rather than testosterone shows saliva androgen responses to exercise in elite female handball players. **Int J Sports Med**. v.21, nº1, p.17-20, Jan, 2000.
49. FRANCIS, C.A.; HECTOR, M.P.; PROCTOR, G.B. Precipitation of specific proteins by freeze-thawing of human saliva. **Archives of Oral Biology** v.45, p.601±606, 2000.
50. FREITAS-FERNANDES, L.B.; RUNDEGREN, J.; ARNEBRANT, T. The content of delmopinol and characterization of the molecular weight pattern of salivary protein precipitates. **Swed Dent J**. v.23, nº2-3, p.107-15, 1999.
51. FREITAS-FERNANDES, L.B.; RUNDEGREN, J.; ARNEBRANT, T.; GLANTS, P-O. Delmopinol hydrochloride- and clorexidine digluconate-induced precipitation of salivary proteins of different molecular weights. **Acta Odontol Scand**. Oslo, v.56, p.2-8, 1998.
52. GARDNER, E.M.D.; GRAY, D.M.S.; O'RAHILLY, R.M. In: *Anatomy: A regional study of human structure*. Philadelphia, Penn, U.S.A., 650-662, 1975.
53. GARRETT, J.R. Adventures with autonomic nerver: perspective in salivary glandular innervation. **Proc. R. Microbiol. Soc**. v.17, p.242-253, 1982.
54. GILBARD, J.P.; FARRIS, R.L.; SANTAMARIA, J. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. **Arch Ophthalmol**. v.96, p.677-681, 1978.
55. GLEESON, M.; PYNE, D.B. Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immol/Lune system: exercise effects on mucosal immol/Lunity. **Immol/Lunol Cell Biol**, v.78, nº5, p.536-44, Oct, 2000.
56. GLEIN, G.W.; ZABETAKIS, P.M.; DEPONQUALE, E.E.; MICHELIS, M.F.; NICOLAS, J.A. Plasma osmolarity, volume and renin activity at the "anaerobic thrashold". **J.Applay Physiol**. v.52, p.991-994, 1984.
57. GRANGER, D.L.; TAINTOR, R.R.; BOOCKVAR, K.S.; HIBBS Jr, J.B. Determination of Nitrate and Nitrit in Biological Samples Usin Bacterial Nitrate Reductase coupled with the Griess reaction. **Methods: A Comp. Meth. Enz**. Califórnia, v.7, p.78-83, Feb, 1995.
58. GREEN, H.J.; HUGSON, R.L.; ORR, G.W.; RANNEY, D.A. Anaerobic threshold, blood lactate and muscle metabolites in progressive exercise. **J Appl Physiol**.v.54,10032-10038, 1983.
59. GRESZ, V.; KWON, T. H.; HURLEY, P. T.; VARGA, G.; ZELLES, T.; NIELSEN, S.; CASE, R. M.; STEWARD, M. C. Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 28, p.G247-G254, 2001
60. GUILBAULT, G. G.; PALLESCHI, G. Non-invasive biosensors in clinical analysis. **Biosensors & Bioelectronic**, n°10, p.379-392, 1995.
 61. HARE, E.R.; VERPOORTE, J.A. The purification of kallikrein from human whole saliva. **Int J Biochem.** v.17, n°5, p.589-95, 1985.
 62. HECTOR, M.P.; LIDEN, R.W.A. The possible role of periodontal mechanoreceptors in the control of paratid secretion in man. **Q J Exp Physiological.** v.72, p.285-301, 1987.
 63. HENSKENS, Y.M.C.; VAN DEN KEIBUS, P.A.M.; VEERMAN, E.C.I.; VAN DER WEIJDEN, G.A.; TIMMOL/LERMAN, M.F.; SNOEK, C.M.; VAN DER VELDEN, U.; AMERONGEN, A.V.N. Protein composition on whole and parotid saliva in healthy and periodontitis subjects. **Jornal of Periodontal Research.** v.31, p.57-65, 1996.
 64. HERRERA, J.L. et al. Saliva: It's a role in health and desease. **J Clin Gastroenteral**, v10, p.569-678, 1988.
 65. HOFMAN, L.F. Human saliva as a diagnostic specimen. **J Nutr.** v.131, n°5, p.1621S-1625S, May 2001.
 66. HOPKINS, B.; WILLIAMS, N.J.; WEBB, M.B. Debenham PG, Jeffreys AJ. The use of minisatellite variant repeat-polymerase chain reaction (MVR-PCR) to determine the source of saliva on a used postage stamp. **J. Forensic Sci.**v.39, n°2, p.526-31, Mar, 1994.
 67. IONTCHEVA, I.; OPPENHEIM, F.G.; TROXLER, R.F. Human salivary mucin MG1 selectively forms heterotypic complexes with amylase, proline-rich proteins, statherin, and histatins. **J Dent Res.** v.76, n°3, p.734-43, Mar, 1997.
 68. IZUTSU, K.T. et al., Whole saliva albumin as an indicator of stomatits in cancer therapy patients. **Cancer.** v.48,p.1450-1454, 1981.
 69. JAGLA, W.; WIEDE, A.; HINZ, M.; DIETZMANN, K.; GULICHER, D.; GERLACH, K.L.; HOFFMANN, W. Secretion of TFF-peptides by human salivary glands. **Cell Tissue Res.** v.298, n°1, p.161-6, Oct, 1999.
 70. JENSEN, J.L.; BRODIN, P.; AARS, H.; BERG, T. Parotid secretion of fluid , amylase and kallikrein during reflex stimulation under normal condition and after acute administration of automic blocking agents. **Acta Physiol Scand.** v.143, p321-329, 1991.
 71. JENSEN, J.L.; KARATSAIDIS, A.; BRODIN, P. Salivary secretion: stimulatory effects of chewing-gum versus paraffin tablets. **European Journal of oral sciences.** v.106, p.892-896, 1998.

72. JENSEN, J.L.; XU, T.; LAMKIN, M.S.; BRODIN, P.; AARS, H.; BERG, T.; OPPENHEIM, F.G. Physiological regulation of secretion of histatin and staterins in human parotid saliva. **J Dent Res.** v73, p.1811-1817, 1994.
 73. JENSEN, K.; JEILEN, J.C.; BRODIN, P.; AARS, H.; BERG, T. Paratid salivary flow in response to mechanical and gustatory stimulation in man. **Acta Physiological Scandinavia.** v.131, p.169-175, 1987.
 74. JENZANO, J.W. et al. Comparison of five techniques for determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical Biochemistry.** North Carolina, v.159, p.370-376, Jul, 1986.
 75. KERLAVAGE, A.R.; FRAZER, C.M.; VENTER, J.C. Muscarinic colinergic receptorstructure: molecular biological support for subtypes. **Trends Pharmacol. Sci.** v.8, p426-431, 1987.
 76. KING, C.E.; MELINYSHYN, M.J.; MEWBURN, J.D.; CURTIS, S.E.; WINN, M.J.; CAIN, S.M.; CHAPLER, C.K. Canine hindlimb blood flow and O₂ uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. **J Appl Physiol.** v.76, p.1166-1171, 1994.
 77. KINGWELL, B.A. Nitric Oxid-mediated metabolic regulation during exercise: effects of trainig in heath and cardiovascular disease. **The FASEB J.** Melbourne, v.14, p.1685-96, Sept, 2000.
 78. KISS, M.A.P.D.; Lima,J.R.P. Limiar de variabilidade da freqüência cardíaca. **Atividade física & Saúde.** v.4: n.º 1, 1999.
 79. KIVELÄ, J. et al. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme VI. **Jornal of Physiology.** Parolannummol/Li, Finlandia, v.520; p.315-320, nº2, Oct, 1999.
 80. KM. The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: biomedical applications in health and disease. **Electrophoresis.** v.12, nº7-8, p.461-471, Jul-Aug, 1991.
 81. KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDT, D.S.; KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDT, D.S.; STAMLER, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. **Nature.**v.372, p.546-548, 1994.
 82. KOBZIK, L.; STRINGER, B.; BALLIGAND, J.L.; REID, M.B.; STAMLER, J.S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. **Biochem Biophys Res Commol/Lun.** v.211, p.375-381, 1995.
 83. KORACEVIC, D.; KORACEVIC, G.; DJORDJEVIC, V.; ANDREJEVIC, S.; COSIC, V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. **J Clin Pathol.** v.54, nº5, p.356-361, May, 2001.
-

84. LAEMMOL/LLI, U.K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. mol. Biol.* v.80, p.575-599, 1973.
85. LAL, K.; POLLOCK, J.J.; SANTARPIA, R.P. 3RD.; HELLER, H.M.; KAUFMAN, H.W.; FUHRER, J.; STEIGBIGEL, R.T. Pilot study comparing the salivary cationic protein concentrations in healthy adults and AIDS patients: correlation with antifungal activity. *J Acquir Immol/Lune Defic Syndr.* v.5, n^o9, p.904-914, 1992.
86. LASHILEY, K.S. Reflex secretion of the human parotid gland. *J Exp. Psychology.* v.1, p.461-493, 1916.
87. LAU, K.S.; GRANGE, R.W.; CHANG, W.J.; KAMMOL/L, K.E.; SARELIUS, I.; STULL, J.T. Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide. *FEBS Lett.* v.431, p.71-74, 1998.
88. LEHMANN, M.; SCHIMID, P.; KEUL, J. Plasam catecholamines and blood lactate accumulation during incremental exhaustive exercise. *Int. Jornal of Sports Med.* v.6, p.78-81, 1985.
89. LEITE, P. F. **Fisiologia do exercício.** Ergometria e condicionamento fisico cardiologia desportiva. 3^a ed. São Paulo: Robe, 1993. 300 p.
90. LENANDER-LUMIKARI, M.; IHALIN, R.; LAÈHTEENOJA, H. Changes in whole saliva in patients with coeliac disease. *Arch Oral Biol.* Turku, Finland, v.26, p.165-173. 2001.
91. LEVINE, M. J. Salivary macromolecules: a struture/fuction synopsis. *Annals of the New York Academy of Science*, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.11-16, Sept, 1993. Número especial.
92. LIU, S.F.; YE, X.; MAZIK, A.B. In vivo inibition of nuclear factor – KB activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and sistemic hipotension in a rat model of septic shoc. *The journal of imunology*, v.159, n.8, p. 3976-3983, 1997.
93. LJUNGBERG, G.; ERICSON, T.; EKBLOM, B.; BIRKHED, D. Saliva and marathon running. *Scand J Med Sci Sports.* v.7, n^o4, p.214-219, Aug.1997.
94. LOHINAI, Z.; BURGHARDT, B.; ZELLES, T.; VARGAS, G. Nitric Oxide modulate salivary amylase and fluid, but not eppidermal growth factor secretion in conscisius rat. *Life sciences*, v.64, n.11, p.953-963. 1999.
95. LOICHOT, C.; KRIEGER, J.P.; DE JONG, W.; HELWIG, J.J.; NISATO, D.; IMBS, J.L.; BARTHELMEBS, M. Shear stress modulates vasopressin-induced renal vasoconstriction in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v.366, n^o6, p.555-561, Dec, 2002.

96. MADER, A. et al. Zur Beurteilung der sportartspezifischen Ausdauerleistungsfähigkeit. **Sportzt Spoetmed.** v.27, p.80-88, 1976.
97. MÄKINEN, K.K. Salivary enzymes. In TENOVUO, J.O. Human saliva: clinical chemistry and microbiology. Boca Raton: FL, CRC Press; v.2, p.93-119, 1984.
98. MANDEL, I.D. Salivary diagnosis: Promises, Promises. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.1-9. Sept.1993. Número especial.
99. MANDEL, I.D. The diagnostic uses of saliva. **J Oral Pathol. Med.** v.19, p.119-125, 1990.
100. MANDEL, I.D., The fuction of saliva. **J Dent Res.** New York, v.66, p.623-627, Feb, 1987.
101. MANDEL, I.D.; ELLISON, S.A. Organic components of human paroted and submaxillary saliva. **Academic of Sciense.** Ann. N.Y, v.131, p.802-811. 1965.
102. MARLETTA, M.A. Mammol/Lalian synthesis of nitrite and N-nitrosalting agents. **Chem. Res. Toxicol**, v.1, p.249-257, 1988.
103. MARTIN, L.; DOGGART, A.L.; WHYTE, G.P.; Comparison of physiological responses to morning and evening submaximal running. **J Sports Sci.** v.19, n°12, p.969-976, Dec, 2001.
104. MATHEWS, M. JIA, H.P.; GUTHMILLER, J.M.; LOSH, G.; GRAHAM, S.; JOHNSON, G.K.; TACK, B.F.; PAUL, B.; MCCRAY, J.R. Production of b-Defensin Antimicrobial Peptides by the Oral Mucosa and Salivary Glands. **Infection and Immol/Lunity.** v.67, p.2740-2745. 1999.
105. MAURIZ JL, TABERNERO B, GARCIA-LOPEZ J, JORQUERA F, VILLA JG, GONZALEZ-GALLEGO. Physical exercise and improvement of liver oxidative metabolism in the elderly. **J. Eur J Appl Physiol.** v.81, n°1-2, p.62-6, Jan, 2000.
106. MAZZEO, R.S.; MARSHALL, P.M. Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. **J. Appl. Physiol.** v.67, p.1319-1322, 1989.
107. MCARDLE, W.P.; KATCH, F.I.; KATCH, V.L. **Exercise physiology, energy, nutrition and humam performance.** Williams&Wilkins, 4.^a ed, 1996.
108. MILLS, P.C.; MARLIN, D.J.; SCOTT, C.M.; SMITH, N.C. Metabolic effects of nitric oxide synthase inhibition during exercise in the horse. **Res Vet Sci.** v.66, n°2, p.135-8, Apr, 1999.
109. MINAGUCHI, K.; BENNICK, A. Invited Review. Genetics of Human Salivary Proteína. **J. Dent. Res.** Chiba City, v.689, n°1, p.2-15, Jan, 1989.

110. MOODY, M.; ZIPP, M.; AL-HASHIMI, I. Salivary anti-spectrin autoantibodies in Sjogren's syndrome. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**v.91, nº3, p.322- , Mar 2001.
111. MORRISON, W.E.; HAAS, E.C.; SHAFFNER, D.H.; GARRETT, E.S.; FACKLER, J.C. Noise, stress, and annoyance in a pediatric intensive care unit. **Crit Care Med.** v.31, nº1, p.113-9, Jan, 2003. Resumo disponível na base de dados MedLine, 1966-2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em Jan, 2003.
112. MURAKAMI, H.; SLY, W.S. Purification and characterization of human salivary carbonic anhydrase. **J Biol Chem.** v.262, nº3, p.1382-1388, Jan, 1987.
113. NAGLER, R.M.; LISCHINSKY, S.; DIAMOND, E.; KLEIN, I.; REZNICK, A.Z. New insights into salivary lactate dehydrogenase of human subjects. **J Lab Clin Med.**v.137, nº5, p.363-9, May, 2001.
114. NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.72-77. Sept, 1993. Número especial.
115. NEDERFORS, T.; DAHLÖF, C. Effects of the beta-adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human whole saliva flow rate and composition. **Acta Oral Biology.** v.37, p.579-584, 1992.
116. NEDERFORS, T.; DAHLÖF, C.; ERICSON, T.; TWETMAN, S. Effects of the antihypertensive drug captopril on human salivary secretion rate and composition. **Eur J Oral Sci.** v.103, p.351-354, 1995.
117. NEWMAN, J.M.B, DORA, K.A, RATTIGAN, S., EDWARDS, S.J., COLQUHOUN, E.Q., e CLARK, M.G. Noraepinefrin and serotonin vasoconstriction in rat hindlimb control different vascular flow routes. **American Journal of Physiology.** v.70, p.E689-E699, 1996.
118. NEXO E, HANSEN MR, KONRADSEN L. Human salivary epidermal growth factor, haptocorrin and amylase before and after prolonged exercise. **Scand J Clin Lab Invest.** Denmark, 1988 May;48(3):269-73.
119. OHO, T.; RAHEMTULLA, F.; MANSSON-RAHEMTULLA, B.; HJERPE, A. Purification and characterization of a glycosylated proline-rich protein from human parotid saliva. **Int J Biochem.** v.24, nº7, p.1159-68, Jul, 1992.
120. ÖZBEK, B.; YÜCEER, S. Alfa-amylase inactivation during Wheat starch Hydrolysis process. **Process Biochemistry.** v-37, p-87-95, Mar, 2001.
121. PANOSSIAN, A.G.; OGANESSIAN, A.S.; AMBARTSUMIAN, M.; GABRIELIAN, E.S.; WAGNER, H.; WIKMAN, G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. **Phytomedicine.** v.6, nº1, p.17-26, Mar, 1999.

122. PARK, Y.C.; JUN, C.D.; KANG, H.S.; KIM, H.M.; CHUNG, H.T. Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. **Immol/Lunology**. v.87, n.2, p.296-302, 1996.
123. PARRY, J. V. Simple and Reliable Salivary Tests for HIV and Hepatitis A and B Virus Diagnosis and Surveillance. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.216-233, Sept, 1993. Número especial.
124. PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; JENSEN, M.; KRZYWKOWSKI, K.; OSTROWSKI, K. Exercise and immol/Lune function: effect of ageing and nutrition. **Proc Nutr Soc**. v.58, n°3, p.733-42, Aug, 1999.
125. PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; JENSEN, M.; TOFT, A.D.; HANSEN, H.; OSTROWSKI, K. Exercise and the immol/Lune system-influence of nutrition and ageing. **J Sci Med Sport**. v.2, n°3, p.234-252, Oct, 1999.
126. PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br J Sports Med**. v.34, n°4, p.246-51, Aug, 2000.
127. PERCIVAL, R.S.; CHALACOMBE, S. J.; MARSH, P.D. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender **J Dent Res**. England, v.73, n°8, p.1416-1420, Aug, 1994.
128. PEREZ NAVERO, J.L.; JARABA CABALLERO, S.; IBARRA DE LA ROSA, I.; JARABA CABALLERO, M.P.; GUILLEN DEL CASTILLO, M.; MONTILLA LOPEZ, P.; TUNEZ FINANA, I.; ROMANOS LEZCANO, A. Effects of competitive physical exercise on neuroendocrine response and interleukin-6 liberation in children. **An Esp Pediatr**. v.51, n°3, p.267-272, Sep, 1999.
129. PERKINS, W.J.; HAN, Y.S.; SIECK, G.C. Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. **J Am Physiol Soc**. p.1326, 1997.
130. PIOTROWSKI, J.; CZAJKOWSKI, A.; MURTY, V.L.; SLOMIANY, A.; SLOMIANY, B.L. Identification of human salivary protease activity toward mucin: differences with caries. **Biochem Int**. v.28, n°5, p.939-947, Dec, 1992.
131. 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. **J. Biol. Chem**. v.275, p.39860-39866, 2000.
132. RAGUNATH, C.; SUNDAR, K.; RAMASUBBU, N. Expression, Characterization, and Biochemical Properties of Recombinant

- Human Salivary Amylase. **Protein Expression and Purification**. p-1-10, Sep. 2001.
133. RAHIM, Z.H.; YAACOB, H.B. Electrophoretic detection of salivary alpha-amylase activity. **J Nihon Univ Sch Dent**. v.34, nº4, p.273-277, Dec, 1992.
 134. RAMASUBBU, N.; REDDY, M.S.; BERGEY, E.J.; HARASZTHY, G.G.; SONI, S.D.; LEVINE, M.J.; Large-scale purification and characterization of the major phosphoproteins and mucins of human submandibular-sublingual saliva. **Biochem J**. v.280, nº2, p.341-352, Dec, 1991.
 135. RANTONEN, P.J.; MEURMAN, J.H. Correlations between total protein, lysozyme, immol/Lunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. **Acta Odontol Scand**. Oslo, v.58, nº4, p.160-5, Aug, 2000.
 136. RANTONEN, P.J.F.; MEURMAN, J.H.. Viscosyt of whole saliva. **Acta Odontol scand**. Oslo, v.56, p.210-214, 1998.
 137. RAYMENT, S.A.; LIU, B.; OFFNER, G.D.; OPPENHEIM, F.G.; TROXLER, R.F. Immol/Lunoquantification of human salivary mucins MG1 and MG2 in stimulated whole saliva: factors influencing mucin levels. **J Dent Res**. New York, v.79, nº10, p.1765-1772, Oct, 2000.
 138. RETTORI, V., LOMNICZI, A., ELVERDIN, J.C., SUBURO, A., FALETTI, A., FRANCHI, A., MCCANN, S.M. Control of salivary secretion by nitric oxide and its role in neuroimmol/Lunomodulation. **Ann N Y Acad Sci**. v.917, p.258-67- 2000. Resumo disponível na base de dados MedLine, 1966-2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em Jan, 2003.
 139. ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J.; JASMAN, A.; BALON, T.W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. **Am. J. Physiol**. v.277, p.E390-E394, 1999.
 140. ROSENHEK, M.; MacPHEASON, L.D.M.; DAWES, C. The effects of chewing-gum stick size and duration of chewing on salivary flow rate and sucrose and bicarbonate concentration. **Arch Oral Biol**. v.38, p.885-891, 1993.
 141. ROWELL, L.B.E.; SHEPERD, J.T. Handbook of Physiology, seção 12: Exercício: Regulation and integration of multipl systems. **Oxford University Press**. p.616-648, 1996.
 142. RUDNEY, J.D.; HICKEY, K.L.; JI, Z. Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, S-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. **J Dent Res**. New York, v.78, nº3, p.759-768, Mar, 1999.
 143. SALVOLINI, E.; MARTARELLI, D.; DI GIORGIO, R.; MAZZANTI, L.; PROCACCINI, M.; CURATOLA, G. Age-related modifications in

- human unstimulated whole saliva: a biochemical study. **Aging**. v12, nº6, p.445-448, Dec, 2000.
144. SCHNEYER, L.H. Sympathetic control of Na, K transport in perfused submaxillary main duct of rat. **Am J. Physiol.** v.230, p341-345, 1977.
145. SCHNEYER, L.H.; YOUNG, J.A.; SCHNEYER, C.A. Salivary secretion of eletrolytes. **Physiol Rev.** v.52, p.720-777, 1972.
146. SEGAL, S. Cell-to-cell commol/Lunication coordinates blood flow control. **Hypertension**. v.23, p.1113-1120, 1994
147. SEGURA, R.; JAVIERRE, C.; VENTURA, J.L.; LIZARRAGA, M.A.; CAMPOS, B.; GARRIDO, E. A new approach to the assessment of anaerobic metabolism: measurement of lactate in saliva. **Br J Sports Med**. v.30, nº4, p.305-9, Dec, 1996
148. SHIRTELIFF, E.A.; GRANGER, D.A.; SCHWARTZ, E.; CURRAN, M.J. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immol/Lunoassay results, **Psyconeuroendocrinology**. Estados Unidos, v.26, p.165-173, Apr, 2001.
149. SILBERGELD, E.K.; New approaches to monitoring environmental neutoxins. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p. 62-71. Sept, 1993. Número especial.
150. SIMÕES, H.G.; CAPBELL, C.S.G.; BALDISSERA, V.; DENADAI, B.S.; KOKUBUN, E. Determinação do limiar anaeróbico por meio de dosagens glicêmicas e lactacidêmicas em teste de pista para corredores. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo, v.12, p.17-30, Jan-Jun, 1998.
151. SKOSNIK, P.D.; CHATTERTON, R.T. JR.; SWISHER, T.; PARK, S. Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress. **International Journal of Psychophysiology**. v.36 p.59-68, Apr, 2000.
152. SMITH, A.M.V.; BOWEN, W.H. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. **Archives of Oral Biology**. Turku, Finland v.45, p.227-291, 2000.
153. STAMLER, J. Nitric oxide in the cardiovascular system. **Review in depth**. In: Nitric Oxide in the Cardiovascular System. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p. 273, 1999.
154. STAMLER, J.S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal musclel. **Physiology Reviews**, North Carolina, v.81, nº1, p.209-237, Jan.2001.

155. STAMLER, J.S.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science**. v.258, p.1898-1902, 1992.
156. STANGHELLE, J.K.; MAEHLUM, S.; SKYBERG, D.; LANDAAS, S.; OFTEBRO, H.; BARDON, A.; CEDER, O.; KOLLBERG, H.; HELLSING, K. Biochemical changes and endocrine responses in cystic fibrosis in relation to a marathon race. **Int J Sports Med**. v.1, p.45-50, Feb, 1988.
157. STEERENBERG, P.A.; VAN ASPEREN, I.A.; VAN NIEUW AMERONGEN, A.; BIEWENGA, A.; MOL, D.; MEDEMA, G.J.; Salivary levels of immol/Lunoglobulin A in triathletes. **Eur J Oral Sci**. v.105, n°4, p.305-9, Aug, 1997.
158. SUDDICK, R.P.; DOWD, F.J. Mechanism of salivary secretion. In:Manaker, L. The biologics basis of dental caries:an oral biology textbook of lewis Manarker. Hagerstow (MD): Haper e Row Publishers , p.67-118, 1986.
159. SUGANO, A.; NOMURA, T. Influence of water exercise and land stretching on salivary cortisol concentrations and anxiety in chronic low back pain patients. **J Physiol Anthropol Appl Human Sci**.v.19, n°4, p.175-180, Jul, 2000.
160. SVOJANOVSKY, S.R.; EGODAGE, K.L.; WU, J.; SLAVIK, M.; WILSON, G.S. High sensytive Eisa determination of taxol in various human biological fluids. **Jornal of pharmaceutical and biomedical Analysis**. v20, p.549-555, 1999.
161. TAYLOR, C.A.; CHENG, C.P.; ESPINOSA, L.A.; TANG, B.T.; PARKER, D.; HERFKENS, R.J. In vivo quantification of blood flow and wall shear stress in the human abdominal aorta during lower limb exercise. **Ann Biomed Eng**. v.30, n°3, p.402-8, Mar, 2002.
162. TENOVUO, J. Antimicrobial fuction of saliva – how important is it for oral health?. **Acta Odontol Scand**. Oslo, v.56, p.250-256, 1998.
163. TISHLER, M.; YARON, I.; SHIRAZI, I.; YARON, M. Saliva: an additional diagnostic tool in Sjogren's syndrome. **Semin Arthritis Rheum**. v.27, n°3, p.173-179, Dec, 1997.
164. TOMASI, T.B.; TRUDEAU, F.B.; CZERWINSKI, D.; ERREDGE, S. Immol/Lune parameters in athletes before and after strenuous exercise. **J Clin Immol/Lunol**. v.2, n°3, p.173-178, Jul, 1982.
165. UITTO, V.J.; SUOMALAINEN, K.; SORSA, T. Salivary collagenase. Origin, characteristics and relationship to periodontal health. **J Periodontal Res**. v.25, n°3, p.135-142, May, 1990.
166. VALDEZ, I.H.; FOX, P.C. Interations of salivary and gastrointestinal system II. Effects of salivary glangs dysfunction on the GI tract. **Dig. Dis**. v.9, p210-218, 1991.

167. VAN DER REIJDEN, W.A. VEERMAN, E.C.I., NIEUW AMERONGEN, A.V. Shear rate dependent viscoelastic behavior of human glandular salivas. *Biorheology*. v.30, n°2, p.141-52, Mar-Apr, 1993.
168. VAN DER SPEK, J. C.; WYANDT, H. E.; SKARE, J. C.; MILUNSKY, A.; OPPENHEIM, F. G.; TROXLER, R. F. *Am. J. Hum. Genet.* Chicago, v.45, p.381-387, 1989.
169. VANDEN ABEELE, A.; COURTOIS, P.; POURTOIS, M. Peroxidase activity loss after filtration and centrifugation of whole saliva. Influence of citrate. *J Biol Buccale*. v.20, n°2, p.91-96, Jun, 1992.
170. VANHOUTTE, P.; MILLER, V. Alpha2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Med.* v.87, p.1S-4S, 1989.
171. VANHOUTTE, P.; VERBEUREN, T.; WEBB, R. Local modulation of adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.* v.61, p.151-247, 1981.
172. VAQUERO, A.F.; LEGIDO, J.C. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amylase. *Can J Appl Physiol*. v.22, n°6, p.553-561. Dec, 1997.
173. VILLIGER, B.; EGGER, K.; LERCH, R.; PROBST, H.; SCHNEIDER, W.; SPRING, H.; TRITSCHLER, T. *Resistência*. Livraria Santos ed.ltda. 1ª ed. 1995.
174. WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci.* v.17, n°2, p.129-134, Feb, 1999.
175. WASSERMAN, K. The anaerobic threshold measurements to evaluate exercise performance. *America Review Respiration Disease*. v.129, p.35-40, 1984.
176. WASSERMAN, K.; HANSEN, J.E.; SUE, D.Y.; WHIPP, B.J. Principles of exercise testing and interpretation. *Lea & Febiger*, Philadelphia, 1986.
177. WASSERMAN, K.; McLLORY, M.B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. *American Jornal Cardiology*. v.14, p.844-852, 1964.
178. WATERMAN, H.A.; BLOM, C.; HOLTERMAN, H.J.; 's-GRAVENMADE, E.J.; MELLEMA, J. Rheological proprieties of human saliva. *Arch Oral Biol*. v.33, p.589-596, 1998.
179. WENQIANG, T.; YI, G.; YU, S.; JUNG, T.; DAYE, S. Extracellular calmodulin-binding proteins in body fluids of animals. *J Endocrinol*. v.155, n°1, p.13-7, Oct, 1997

180. WICKSTROM, C.; CHRISTERSSON, C.; DAVIES, J.R.; CARLSTEDT, I. Macromolecular organization of saliva: identification of 'insoluble' MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase. *Biochem J.* v.2, p.421-428, Oct, 2000.
181. WILLIAMS, P.L. Alimentary system. In: Williams, P.L. e Wawick, R, editor. **Gray's anatomy**.36^a ed.Edinburgh: Churchill Livingstone, p.1267-1281, 1980.
182. WILSON, J.T. Clinical Correlates of Drugs in saliva. **Annals of the New York Academy of Science**. Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.48-61, Sept, 1993. Número especial.
183. YOUNG, J.A.; VAN LENNEP, E.W. Secretion of salivary and salt gland. In: GIEBISCH, G., TOSTESON, D.C; USSING, H.H. Editors Membrane transport in biology, Berlin; **Springer-Verlag**, p.563-74, 1979.
184. ZANZINGER, J.; CZACHUSRSKI, H.; SELLER, H. Inhibition of sympathetic vasoconstriction is a major principle of vasodilation by nitric oxide in vivo. *Circ Res.* v.75, p.1073-1077, 1994.
185. ZHANG, P.; TOKURA, H. Thermoregulatory responses in humans during exercise after exposure to two different light intensities. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* v.79, n°3, p.285-289, Feb, 1999.

2 CAPITULO I: PROTEÍNA TOTAL SALIVAR: UM NOVO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DO LIMIAR ANAERÓBICO.

2.1 RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a concentração da proteína total salivar e compara-la à concentração de lactato sangüíneo, durante exercício com incremento de cargas. Quinze homens saudáveis não fumantes realizaram um teste máximo em cicloergômetro. O teste iniciou com 50 Watts (W), aumentando de 50 em 50W até 200W, em seguida aumentando de 25 em 25W até a exaustão, com duração de 3min por estágio. Coletou-se sangue e saliva no final de cada estágio. O limiar anaeróbico de lactato (AT), esta de acordo com o que há na literatura. Nossos resultados não mostraram diferenças significativas (teste t-student) e ainda encontrou-se altas correlações de Pearson ($p < 0,05$) de $r = 0,95$ para lactato comparado com proteína total salivar sozinha, dividida por W ou pela média da frequência cardíaca (mFC - para limiares expressos em W ou mFC); para o lactato dividido por W ou pela mFC comparado com proteína total salivar sozinha dividida por W ou pela mFC, encontrou-se $r = 0,89$ (para limiares expressos em W) e $r = 0,87$ (para limiares expressos em mFC). Portanto conclui-se que o limiar anaeróbico de proteína total salivar está fortemente correlacionado ao limiar de lactato sangüíneo, podendo ser usado como um novo método na determinação do limiar anaeróbio.

Palavras chaves: Proteína total salivar, Limiar anaeróbico, Saliva, Exercício, Lactato.

2.2 INTRODUÇÃO

A análise de biomarcadores salivares representa uma importante alternativa de monitoramento do exercício físico, pois além de serem marcadores do estado fisiológico normal e fisiopatológico (GUILBAULT e PALLESCI, 1995) são também do fisiológico do exercício. Pesquisadores analisaram alguns destes biomarcadores salivares (em humanos), tais como, IgA, proteína total, alfa amilase salivar, eletrólitos durante exercício físico (RANTONEN e MEURMAN, 2000; WALSH et al., 1999; CHICHARRO et al., 1994 e 1998; CALVO et al., 1997) e descobriram altas correlações entre a concentração de lactato sangüíneo com a atividade da alfa amilase e concentração de eletrólitos, definindo limiares anaeróbicos salivares (CHICHARRO et al., 1994 e 1998; CALVO et al., 1997). No entanto, para a concentração de proteína total salivar, dentro da revisão deste estudo, não há ainda uma descrição de sua correlação com o limiar anaeróbico lactato sangüíneo.

A hipótese para estabelecer a correlação entre proteína total salivar e lactato sangüíneo, refere-se ao controle simpático e parassimpático nas glândulas salivares. A estimulação simpática, via noraepinefrina, promove o aumento da secreção de proteínas enquanto que a parassimpática, via acetilcolina, induz a produção de fluido na saliva. Além disso, a localização adjacente dos nervos autônomos às células acinares e aos ductos, sugere um papel fundamental na resposta regulatória em todos os tipos de células das glândulas (SCHNEYER, 1977; DENNISS e YOUNG, 1979), as quais tem suas respostas seguindo o ciclo circadiano (DAWES, 1981; KIVELÄ et al., 1997).

O aumento na secreção de proteínas salivares pela a atividade simpática pode ser direto, ou via impulso neural às glândulas salivares ou através das catecolaminas atuando nos β -adrenoceptores. Nederfors e Dahlöf, (1992) demonstraram que um bloqueio nos β -adrenoceptores das glândulas salivares, pode reduzir significativamente tanto a proteína total como a atividade da α -amilase .

A partir da descoberta do limiar anaeróbico salivar (Th_{sa}), definido como sendo "a intensidade na qual há o primeiro aumento contínuo de um destes, Cl^- , Na^+ ou K^+ , durante o exercício", e o limiar de catecolaminas (Th_{ca}) como sendo "o ponto no qual há um aumento não linear ou da nora-adrenalina ou da adrenalina" (CHICHARRO et al., 1994), foi possível encontrar outros limiares anaeróbicos salivares, tais como o limiar a partir da análise da concentração de amilase salivar, na saliva total, durante teste de exercício em laboratório, definido como sendo "a intensidade na qual há o primeiro aumento contínuo da amilase salivar durante o exercício" (CALVO, et al., 1997) que em outro trabalho foi redefinido mais tarde como sendo "a intensidade na qual os níveis da alfa-amilase salivar e eletrólitos (especialmente Na^+) começam aumentar acima dos níveis basais" (CHICHARRO, et al., 1998). Faz-se importante para nosso estudo ressaltarmos a definição de limiar anaeróbico de lactato de WASSERMAN, (1986) definido como "o ponto de inflexão da lactatemia, caracterizado pela transição do aumento linear para exponencial", pois é base das pesquisas de limiares anaeróbicos salivares.

Um dado importante citado no trabalho de Walsh et al., (1999) que avaliou a concentração salivar de IgA, de proteína total e a atividade da alfa-amilase durante exercício intenso intermitente, revelou que a concentração de proteína aumentou três vezes ($p < 0.01$) quando comparado com os níveis de pré-teste, retornando aos valores iniciais encontrados antes do exercício, após duas horas e meia do término do mesmo.

Assim, apesar da resposta do lactato, do sistema nervoso autônomo (SNA), da secreção salivar durante o exercício e as relações entre eles estarem bem descritas na literatura, até este trabalho não se encontraram descrições nenhuma durante o exercício físico, entre concentração de proteína total salivar e concentração de lactato sangüíneo. Sendo interessante ressaltar o baixo custo para se dosar a proteína total salivar em relação ao lactato sangüíneo.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar uma alta correlação da concentração de proteína total salivar com a concentração de lactato sanguíneo, durante exercício em cicloergômetro com cargas crescentes.

2.3 MÉTODO

O projeto foi aprovado pelo conselho de ética da Universidade Federal de Uberlândia.

2.3.1 VOLUNTÁRIOS

Após carta informativa a várias pessoas, selecionou-se 22 homens saudáveis não fumantes, os quais assinaram um termo de consentimento conforme determina o Conselho Nacional de Saúde do Brasil, resolução 2/01. Destes voluntários, sete (07) não puderam ser aproveitados em nosso estudo, pois em dois (02) voluntários não foi possível identificar nenhum ponto de inflexão tanto na curva de lactato como na de proteína total (um terminou o teste antes até 200W e o outro terminou antes de 250W); dois (02) voluntários não puderam ser aproveitados por erro na análise ou na estocagem do sangue e dois (02) por falta de amostra de saliva e um (01) por erro na dosagem de proteína total.

Assim o "n" deste trabalho foi de 15 homens saudáveis não fumantes (idade em anos: 24,3, +/-4,9; altura em metros: 1,78, +/-0,08; peso em kg: 72,3, +/-8). Pediu-se aos voluntários (oito ciclistas, quatro jogadores de basquete e três praticantes de atividade física não específica) que não fizessem esforço pesado ou moderado, no dia anterior ao mesmo, que sua última refeição fosse pelo menos duas horas antes do teste, que ingerissem bastante água no dia do teste e no dia anterior, que não ingerissem qualquer substância estimulante (café, guaraná...), ou contendo corantes e que a higiene bucal fosse feita corretamente.

2.3.2 TESTE CICLO ERGOMÉTRICO

Todos os testes no ciclo ergômetro (Ergofit 167, German) foram realizados entre 15:30 e 17:30 horas, com a temperatura da sala sendo mantida em 25°C. Todos os voluntários ingeriram +/- 400mL água, 30 minutos antes do teste e realizaram o teste com os pés fixados no pedal através de sapatilhas próprias ou amarrados. Previamente os voluntários realizaram alongamento e um breve aquecimento de dois minutos (sem carga na bicicleta). Sua frequência cardíaca foi mensurada com um frequencímetro com interface (Polar, S610). O teste iniciou com 50 Watts (W), aumentando de 50 em 50W até 200W, em seguida aumentando de 25 em 25W até a exaustão, com duração de 3min por estágio, sendo a frequência de rotação, no cicloergômetro, sendo realizada estritamente entre 58 e 62 rpm.

2.3.3 COLETA DA SALIVA

A saliva estimulada, por goma de mascar (trident-menta), foi coletada pelo método de cuspe segundo Navazesh, (1993). Dez minutos antes do teste físico, coletou-se saliva estimulada durante os primeiros cinco (05) minutos (saliva basal), onde a saliva dos dois (02) primeiros minutos foi rejeitada e a dos três (03) restantes era coletada numa proveta graduada. Logo antes desta coleta o voluntário enxaguou a boca várias vezes com água desionizada, para limpeza de "debris" celulares e outros. Avisava-se o voluntário 30 segundos antes de cada mudança de estágio, para que engolisse a saliva e começasse a mastigar o chiclete. A coleta da saliva iniciava 10 segundos antes de terminar o estágio. A saliva era colocada em mini-tubos pré-resfriados (4°C) durante um tempo máximo de três horas, centrifugada a 14.000g descartado-se o pélet e congelado o sobrenadante à -20°C. A proteína total foi mensurada (saliva pura) pelo método de Bradford (1976), com as amostras sendo lidas entre 10'20" e 10'30", após se colocar o reagente de Bradford. As siglas PRO, PRO/W e PRO/FC significam proteína total saliva sozinha, dividida pela carga em watts e dividida pela média da frequência cardíaca respectivamente. A definição de limiar anaeróbico de Wasserman, (1986) foi tomada como base se uma definição de limiar anaeróbico de proteína total salivar (PAT). Ao

utilizar-se da definição de Villiger et al., (1995) e Kiss e Lima, (1999) junto com a de Wasserman, (1986), propomos uma outra definição para o PAT. Todos os limiares PAT foram identificados por inspeção visual.

2.3.4 COLETA DO SANGUE

O sangue (25 μ L) foi coletado com capilares heparinizados e colocados em mini-tubos com 50 μ L de fluoreto de sódio e armazenados no gelo por no máximo 3 horas e congelado à -20°C. O lactato sangüíneo foi analisado por método eletro-enzimático (lactímetro YSI 1500 Sport da Yellow Springs). As siglas LSG, LSG/W e LSG/FC significam lactato sangüíneo sozinho, dividido pela carga em watts e dividido pela média da frequência cardíaca respectivamente. A definição de limiar anaeróbico base foi a de Wasserman, (1986), e junto a ela a definição de Villiger et al., (1995) e Kiss e Lima, (1999), propomos uma outra definição. Todos os limiares AT foram identificados por inspeção visual.

2.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t-student para amostras dependentes foi utilizado para se identificar se as médias dos limiares AT e PAT eram diferentes. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para estabelecer a correlação entre o AT e PAT com $\alpha = 0,05$. O intervalo de confiança também foi utilizado para reafirmar os resultados obtidos.

2.4 RESULTADOS:

A tabela 8 mostra as correlações de Pearson ($p < 0,05$) e t-student dos limiares AT (LSG, LSG/FC e LSG/W) e PAT (PRO, PRO/FC e PRO/W). Correlações altas de $r=0,95$ para LSG com PRO, PRO/FC e PRO/W, quando os limiares foram expressos em watts (W) ou média da frequência cardíaca (mFC); de $r=0,89$ para LSG/FC e LSG/W com PRO, PRO/FC e PRO/W, (limiares expressos em W); de $r=0,87$ LSG/FC e LSG/W com PRO, PRO/FC e PRO/W, (limiares expressos em mFC). No teste de t-student encontrou-se um $p > 0,05$ para todas as médias das variáveis, mostrando que em nível de significância (α) de 0,05, os limiares AT e PAT são iguais.

A tabela 9 mostra, além das médias dos limiares e desvios padrões o intervalo de confiança das médias ($\alpha = 0,05$) dos 15 voluntários. Podemos observar que estatisticamente os intervalos são iguais, pois todos os intervalos de confiança sobrepõem-se. Sendo este mais um dado que dá suporte à validação do PAT.

A tabela 10 mostra as médias das frequências cardíacas dos 15 voluntários em cada estágio. Pode-se notar que nos primeiros estágios (repouso, média=66 bpm, $\pm 3,15$; primeiro estágio, média= 93,16 bpm, $\pm 7,16$; segundo estágio, média=106,06 bpm $\pm 8,33$) as médias da FC são, numericamente, maiores que os W correspondentes (0, 50 e 100 respectivamente), podendo interferir na definição de limiar.

A tabela 11 mostra as médias da concentração de proteína total salivar, no estágio basal e trinta minutos após o exercício. Podemos notar a sobreposição dos intervalos de confiança ($\alpha=0,05$), isso quer dizer que estatisticamente a concentração no estágio basal e trinta minutos após o teste são iguais. É interessante notar que dos 15 indivíduos, cinco tiveram suas concentrações de proteína total iguais ou inferiores aos níveis basais, oito tiveram suas concentrações de proteína total perto dos níveis basais e dois distantes.

Nas figuras 8 e 9, é mostrada na ordenada a esquerda a concentração de lactato sangüíneo (LSG) em mmol/L, na direita a concentração de proteína total (PRO) em mg/mL e na abscissa, a carga em W de cada estágio. Pode-se notar os dois limiares (AT e PAT) dos voluntários em 225W. É interessante notar a quase há uma sobreposição das curvas de variação de proteína total salivar de lactato.

Nas figuras 10 e 11 é mostrado na ordenada da esquerda, as concentrações de lactato sangüíneo em mmol/L dividido pela mFC (LSG/FC) e pela carga em W (LSG/W) e na da direita a concentração de proteína total em mg/mL dividido pela mFC (PRO/FC) e pela carga em W (PRO/W) e na abscissa a carga em W de cada estágio. Pode se notar que os limiares dos voluntários também estão em 225W.

Nas figuras 12 e 13, é mostrado na ordenada a esquerda as concentrações de lactato sangüíneo em mmol/L (LSG), a direita a concentrações de lactato sangüíneo dividido pela mFC (LSG/FC) e pela carga em W (LSG/W), e na abscissa a carga em W dos estágios. Como já mostrado nas figuras 8, 9, 10 e 11 os limiares também estão em 225W.

Nas figuras 14 e 15, é mostrado na ordenada a esquerda a concentrações de proteína total salivar em mg/mL (PRO), a direita a concentrações de proteína total salivar em mg/mL dividido pela mFC (PRO/FC) e pela carga em W (PRO/W), e na abscissa a carga em W dos estágios. Como já mostrado nas figuras 8, 9, 10 e 11 os limiares estão em 225W.

Observando as figuras 8, 9, 10 e 11, podemos demonstrar as três formas de expressar o AT e o PAT; definidas neste estudo: (1ª) Na ordenada da esquerda concentrações de lactato (mmol/L) e na da direita concentração de proteína total salivares (mg/mL); na abscissa a carga em W (correspondente de cada estágio). (2ª) Ao dividirmos, tanto as concentrações de lactato quanto às de proteína total salivar, pela frequência cardíaca teremos: na ordenada da esquerda concentração de lactato/mFC (mmol/L/FC) e na da direita a concentração de proteína total salivares/mFC (mg/mL/FC), e

na abscissa a carga em W (correspondente de cada estágio). (3ª) Ao dividirmos tanto as concentrações de lactato quanto as de proteína total salivar pela carga em W teremos: na ordenada da esquerda, concentrações de lactato/W (mmol/L/W) e na da direita a concentração de proteína total salivares/W (mg/mL/W); na abscissa a carga em W. Para o limiar de lactato, além da definição clássica de AT como sendo "a intensidade de inflexão da lactatemia, caracterizado pela transição do aumento linear para exponencial" (WASSERMAN, K., 1986) temos também "*a intensidade na qual há um aumento contínuo não linear ou tendendo a exponencial da concentração de lactato dividido pela carga (watts) ou média da FC*" e para o limiar anaeróbico de proteína total da saliva (PAT) temos a definição de "*a intensidade na qual há um aumento contínuo, não linear tendendo a exponencial, da concentração de proteína total da saliva*" ou "*a intensidade qual há um aumento contínuo, não linear ou tendendo a exponencial, da concentração de proteína total da saliva dividida pela carga (watts) ou média da FC*".

Graficamente o modo de se identificar, mais facilmente, os limiares de lactato e principalmente o de proteína total, foi aquele em que dividimos suas concentrações pela frequência cardíaca, como nas figuras 10 e 11.

As tabelas de 12 à 14 mostram os valores individuais dos dados pessoais durante o teste (peso, altura, idade e tempo de exercício), da concentração de lactato sanguíneo em mmol/L e proteína total saliva.

É importante ressaltar que dos quinze voluntários, quatorze tiveram os limiares AT (LSG) e PAT (PRO) iguais e onze destes tiveram todos os seus limiares AT e PAT iguais (LSG, LSG/W, LSG/FC, PRO, PRO/W e PRO/FC) (nove com limiares acima de 200W e dois com limiares respectivos iguais a 100 e 150W). Os demais voluntários tiveram seus limiares AT e PAT, entre 150 e 200 W. Dois destes voluntários, tiveram os próprios limiares de lactato (LSG, LSG/W e LSG/FC) na faixa 150 e 200W, indicando assim, que seus limiares reais estão próximos do meio da faixa (entre 150 e 200W).

Tabela - 8

CORRELAÇÃO DE PEARSON ($\alpha < 0,05$) E t-STUDENT PARA AMOSTRAS PAREADAS ENTRE O "AT" E "PAT".

Quando os limiares foram analisados, numericamente, em Watts.

	LSGFC_W		LSGW_W		LSG_W	
	Correl. Pearson	t-student	Correl. Pearson	t-student	Correl. Pearson	t-student
PROFC_W	r=0,89	p <0,082	r=0,89	p <0,082	r=0,95	p <0,33
PROW_W	r=0,89	p <0,082	r=0,89	p <0,082	r=0,95	p <0,33
PRO_W	r=0,89	p <0,082	r=0,89	p <0,082	r=0,95	p <0,33

Quando os limiares foram analisados, numericamente, em frequência cardíaca.

	LSGFC_FC		LSGW_FC		LSG_FC	
	Correl. Pearson	t-student	Correl. Pearson	t-student	Correl. Pearson	t-student
PROFC_FC	r=0,87	p <0,082	r=0,87	p <0,082	r=0,95	p <0,33
PROW_FC	r=0,87	p <0,082	r=0,87	p <0,082	r=0,95	p <0,33
PRO_FC	r=0,87	p <0,082	r=0,87	p <0,082	r=0,95	p <0,33

LSG/FC: Lactato sangüíneo - com limiar determinado pela concentração de ácido láctico sangüíneo dividido pela média da frequência cardíaca e expressado pela mesma; LSG/W: Lactato sangüíneo - com limiar determinado pela concentração de ácido láctico sangüíneo dividido por watts e expressado pelo mesmo; LSG: Lactato sangüíneo - com limiar determinado pela concentração de ácido láctico sangüíneo; PRO/FC: Proteína total - com limiar determinado pela concentração de proteína total salivar dividido pela média da frequência cardíaca e expressado pela mesma; PRO/W: Proteína total - com limiar determinado pela concentração de proteína total salivar dividido por watts e expressado pelo mesmo; PRO: Proteína total - com limiar determinado pela concentração de proteína total salivar;

Tabela - 9

MÉDIA COM DESVIO PADRÃO E INTERVALO DE CONFIANÇA DAS MÉDIAS DOS LIMIARES DE LACTATO E PROTEÍNA E TOTAL DA SALIVA.					
	Média	Desv. Pad.	Intervalo de confiança ($\alpha=0,05$)		
Valores em Watts					
LSG/FC	188,3333333	45,1848057	163,308333	< μ <	213,358333
LSG/W	188,3333333	45,1848057	163,308333	< μ <	213,358333
LSG	195	42,4684757	171,479403	< μ <	218,520597
PRO/FC	198,3333333	40,6055356	175,844501	< μ <	220,822166
PRO/W	198,3333333	40,6055356	175,844501	< μ <	220,822166
PRO	198,3333333	40,6055356	175,844501	< μ <	220,822166
Valores em Freqüência Cardíaca					
LSG/FC	138,5468	15,4849928	129,970644	< μ <	147,122956
LSG/W	138,5468	15,4849928	129,970644	< μ <	147,122956
LSG	141,0981333	15,2260865	132,665369	< μ <	149,530898
PRO/FC	142,3454667	15,1312781	133,965211	< μ <	150,725723
PRO/W	142,3454667	15,1312781	133,965211	< μ <	150,725723
PRO	142,3454667	15,1312781	133,965211	< μ <	150,725723

LSG/FC: Lactato sangüíneo - com limiar determinado pela concentração de ácido láctico sangüíneo dividido pela média da freqüência cardíaca e expressado pela mesma; **LSG/W:** Lactato sangüíneo - com limiar determinado pela concentração de ácido láctico sangüíneo dividido por watts e expressado pelo mesmo; **LSG:** Lactato sangüíneo - com limiar determinado pela concentração de ácido láctico sangüíneo; **PRO/FC:** Proteína total - com limiar determinado pela concentração de proteína total salivar dividido pela média da freqüência cardíaca e expressado pela mesma; **PRO/W:** Proteína total - com limiar determinado pela concentração de proteína total salivar dividido por watts e expressado pelo mesmo; **PRO:** Proteína total - com limiar determinado pela concentração de proteína total salivar;

Tabela - 10

MÉDIA DAS "FC" DE CADA ESTÁGIO			
ESTÁGIOS	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
0	15	66,00	3,15
01	15	93,16	7,16
02	15	106,06	8,33
03	15	123,22	11,94
04	15	142,30	11,90
05	15	154,77	16,12
06	14	165,85	14,59
07	12	176,04	12,55
08	8	178,28	8,31
09	7	186,83	9,10
10	2	173,00	17,17

P.S.: Nº significa número de indivíduos.

Tabela - 11

MÉDIAS E INTERVALO DE CONFIANÇA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL DOS 15 VOLUNTÁRIOS EM REPOUSO E 30 MINUTOS APÓS O TESTE			
	Média	Desvio padrão	Intervalo de Confiança
BASAL	0,532208007	0,222780666	0,408823916 < μ < 0,655592097
30 MIN PÓS-TESTE	0,732064	0,444347	0,485968314 < μ < 0,978159201

Tabela - 12

VALORES INDIVIDUAIS				
	PESO	ALTURA	IDADE	TEMPO TOTAL
MVF	92	1,9	25	19'50"
AMV	80	1,98	22	19'
JTJ	64	1,74	30	26'
CSS	58	1,73	19	21'
RRC	75	1,75	29	27'40"
MAP	70,5	1,7	30	27'35"
FMR	70	1,79	23	24'55"
LGD	70	1,75	23	24'15"
VPM	68,5	1,79	30	31'08"
LSB	82	1,88	20	22'03"
OSS	74	1,66	33	27'
ACS	68,3	1,71	21	16'20"
WBO	73,5	1,8	19	13'30"
EMS	71	1,77	18	21
SRM	67,5	1,76	22	18'

Tabela - 13

VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO SANGÜÍNEO EM mmol/L.

	T00	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	TR7	TR30
MVF	1,44	1,47	1,83	2,37	5,46	8,01	11,01	17,04				17,07	10,44
AMV	1,11	1,26	1,59	2,04	3,87	6	10,71					11,13	6,99
JTJ	0,81	1,08	1,38	1,5	2,28	1,62	2,58	4,17	8,01	14,79		10,41	4,62
CSS	1,2	0,81	0,81	1,35	1,77	3,18	5,94	9,24				9,36	4,32
RRC	1,62	1,8	1,29	1,59	2,73	3,42	5,85	5,49		15,66		13,68	6,48
MAP	2,25	1,47	1,41	1,5	1,71	1,68	2,46	3,51	6,69	8,94		9,27	4,74
FMR	1,5	1,11	1,05	0,99	1,2	1,56	2,67	5,34	10,41			10,86	6,51
LGD	0,540	0,66	1,11	1,29	1,44	3,24	5,76	9,36				7,2	3,84
VPM	0,690	0,84	0,81	0,87	1,14	1,38	2,13	2,4	4,08	4,08	11,16	10,56	5,28
LSB	1,800	1,71	1,68	2,52	3	4,92	6,78	11,04				11,49	4,02
OSS	0,600	0,87	1,02	1,02	1,35	1,98	2,94	4,53	6,42	8,91		9,15	4,53
ACS	0,960	1,32	1,83	3,84	7,2		13,56					14,37	9,87
WBO	0,840	1,08	1,77	3,15	5,82	7,8						9,42	4,95
EMS	1,140	1,23	1,65	1,95	3,51	7,47	6,93	12,57				13,56	7,08
SRM	0,870	0,84	1,62	2,91	5,4	8,97	13,65					12,27	5,61

P.S.: A letra "T" significa teste e as numerações são os estágios do teste. Ex.: T06 significa o 6º estágio de teste. Lembrando que cada estágio tem uma duração de 3 minutos. A letra "R" significa recuperação pós-exercício.

As letras da 1ª coluna significam as iniciais de cada voluntário.

Tabela - 14

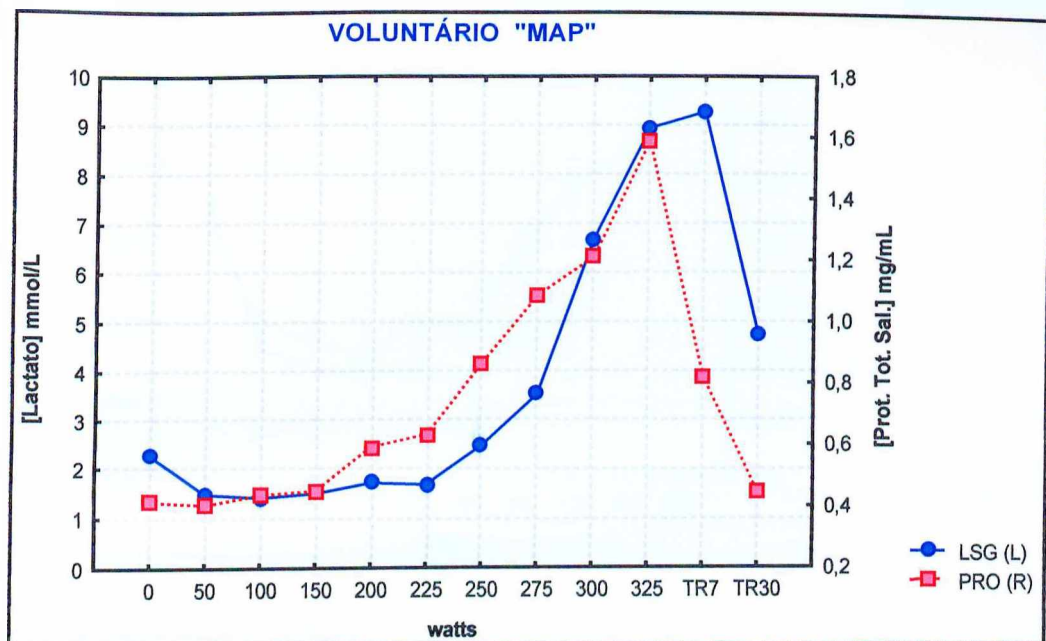
VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL SALIVAR EM mg/mL.

	T00	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	TR7	TR30
MVF	0,629	0,767	0,842	0,568	0,636	0,989	1,419	1,839				0,86	0,61
AMV		0,576	0,66	0,404	0,566	1,246	1,59					1,038	0,676
JTJ	0,439	0,504	0,666	0,684	1,074	1,068	1,47			1,775		0,986	0,571
CSS	0,811	0,785	1,06	1,004	1,087	1,384	1,466	2,03				1,504	1,487
RRC	0,467	0,572	0,488	0,526	0,702	0,843	1,112		1,353	1,488		1,536	0,539
MAP	0,41	4,014	0,434	0,448	0,588	0,63	0,864	1,087	1,21	1,587		0,819	0,43
FMR	0,424	1,001	0,972	0,978	1,158	1,516	1,612		2,363			1,48	0,89
LGD	0,215	0,636	0,5	0,502	0,383	0,392	0,494	0,671	1,061			0,389	0,435
VPM	0,628	1,426	1,412	1,192	1,151	1,006	1,107	1,262	1,609	1,782	2,14	1,276	0,53
LSB	0,424	0,629	0,674	0,527	0,652	0,766	1,02	1,621				0,838	0,289
OSS	0,664	0,907	1,061	1,124	1,351	1,798	2,278	2,709		2,838		2,288	1,384
ACS		1,133	1,273	1,44	2,055	2,368	2,693					2,456	1,692
WBO	0,43	0,551	0,453	0,46	0,851	1,581						0,39	0,516
EMS	0,352	0,467	0,49	0,513	0,535	0,725	1,043	1,777				0,553	0,714
SRM	0,381	0,436	0,407	0,463	0,452	0,647	0,039					0,204	0,198

P.S.: A letra "T" significa teste e as numerações são os estágios do teste. Ex.: T06 significa o 6º estágio de teste. Lembrando que cada estágio tem uma duração de 3 minutos. A letra "R" significa recuperação pós-exercício.

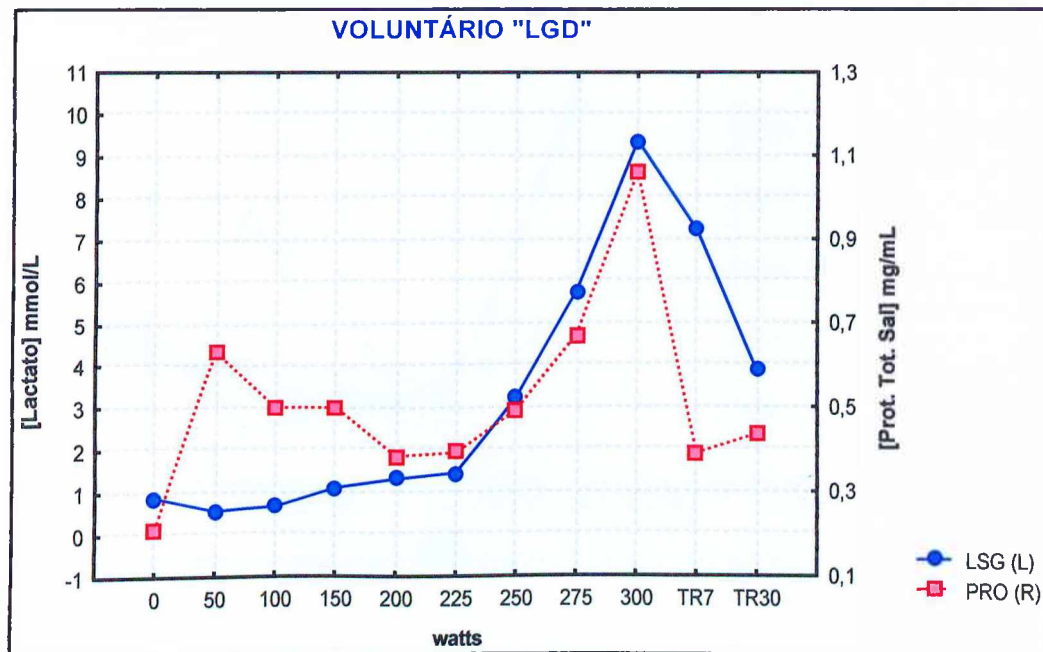
As letras da 1ª coluna significam as iniciais de cada voluntário.

Figura - 8. Limiares PAT e AT.



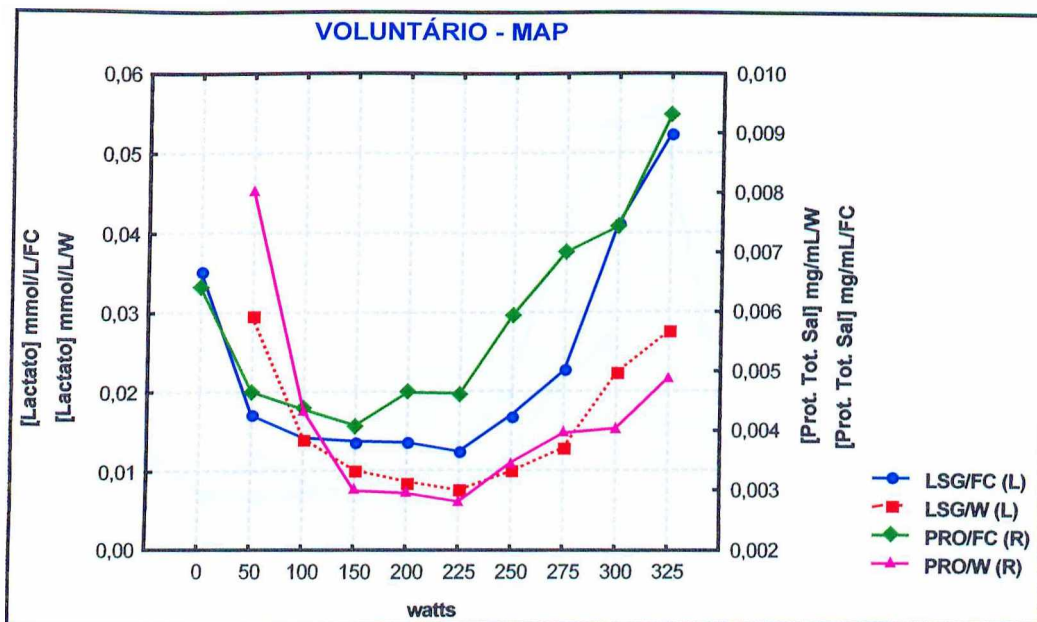
Nestes gráficos podemos observar os limiares PAT e AT (225W) de um voluntário quando acontece o aumento tendendo a exponencial da proteína total salivar (PRO) e do lactato sanguíneo (LSG). É interessante notar a quase perfeita sobreposição das duas curvas.

Figura - 9- Limiares PAT e AT.



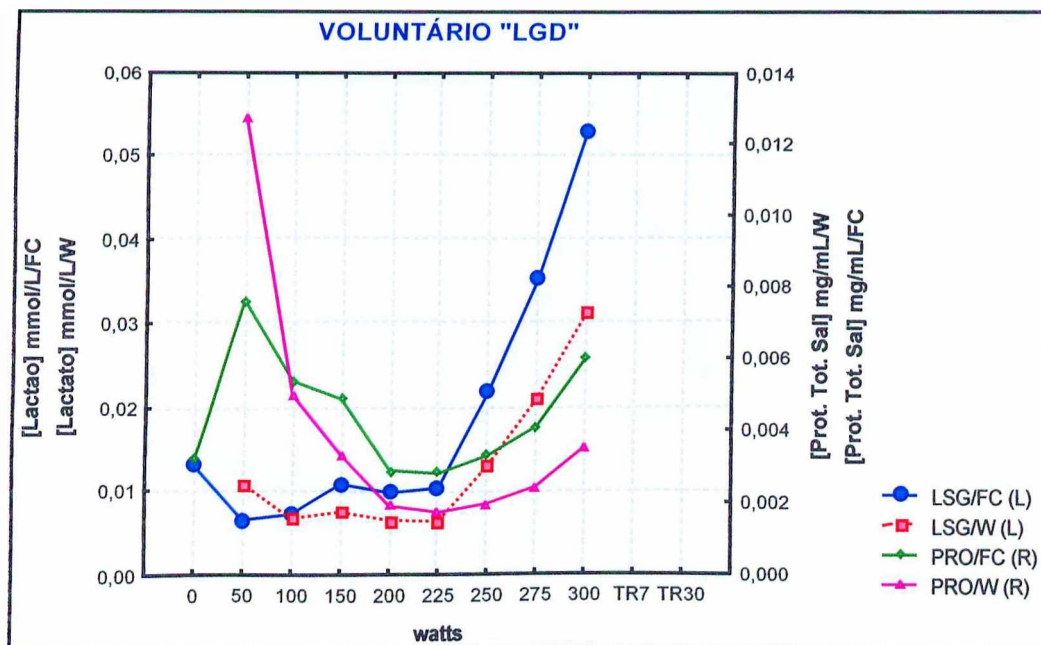
Nestes gráficos podemos observar os limiares PAT e AT (225W) de um voluntário quando acontece o aumento tendendo à exponencial da proteína total salivar (PRO) e do lactato sanguíneo (LSG).

Figura - 10 - Limiares PATW, PAT/FC, ATW e AT/FC



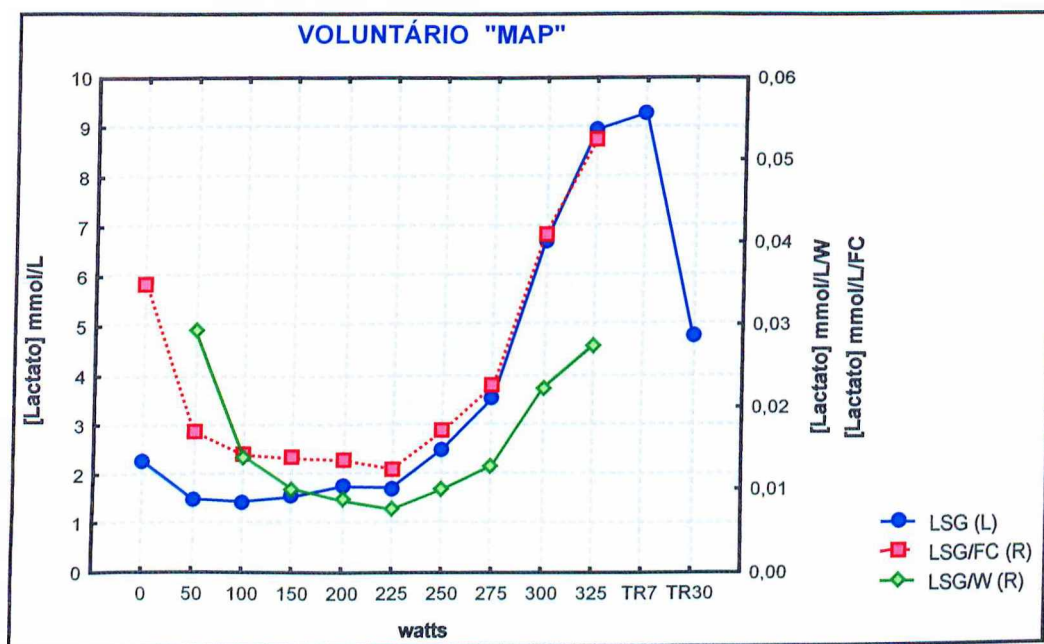
Pode-se observa os limiares PAT e AT (225W) de um voluntário quando acontece o aumento não linear ou tendendo à exponencial. A concentração de lactato e proteína total salivar foram divididos tanto pela FC (LSGFC e PROFC) quanto pelo W (LSGW e PROW).

Figura - 11- Limiares PAT/W, PAT/FC, ATW e AT/FC.



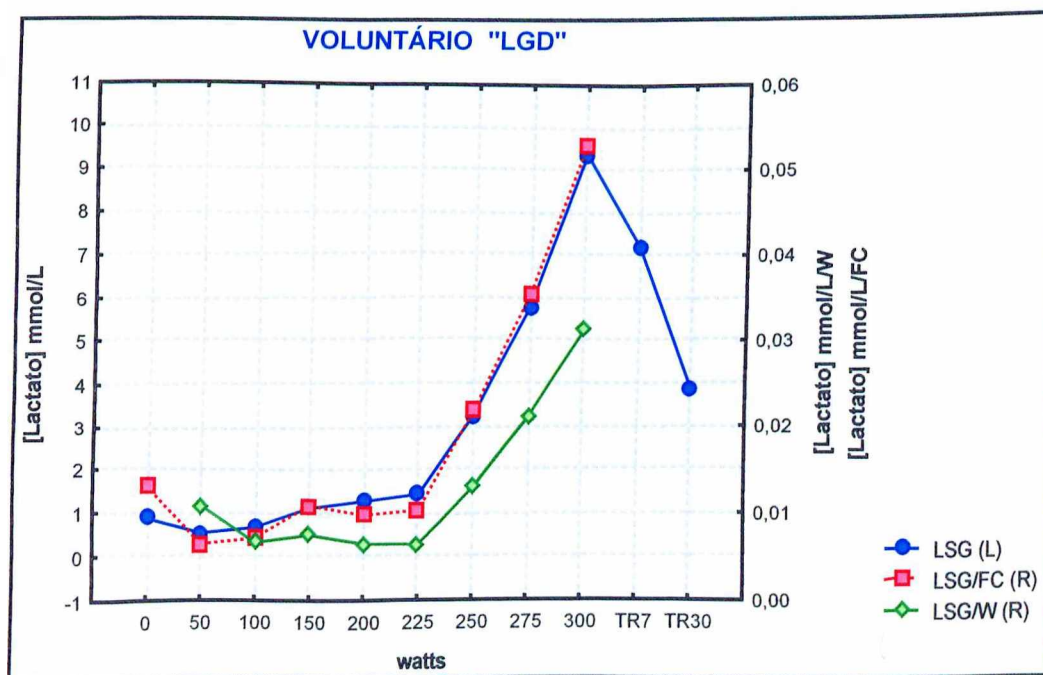
Nestes gráficos podemos observar os limiares PAT e AT (225W) de um voluntário quando acontece o aumento não linear ou tendendo à exponencial. A concentração de lactato e proteína total salivar foram divididos tanto pela FC (LSGFC e PROFC) quanto pelo W (LSGW e PROW).

Figura - 12- Limiares AT, AT/W e AT/FC.



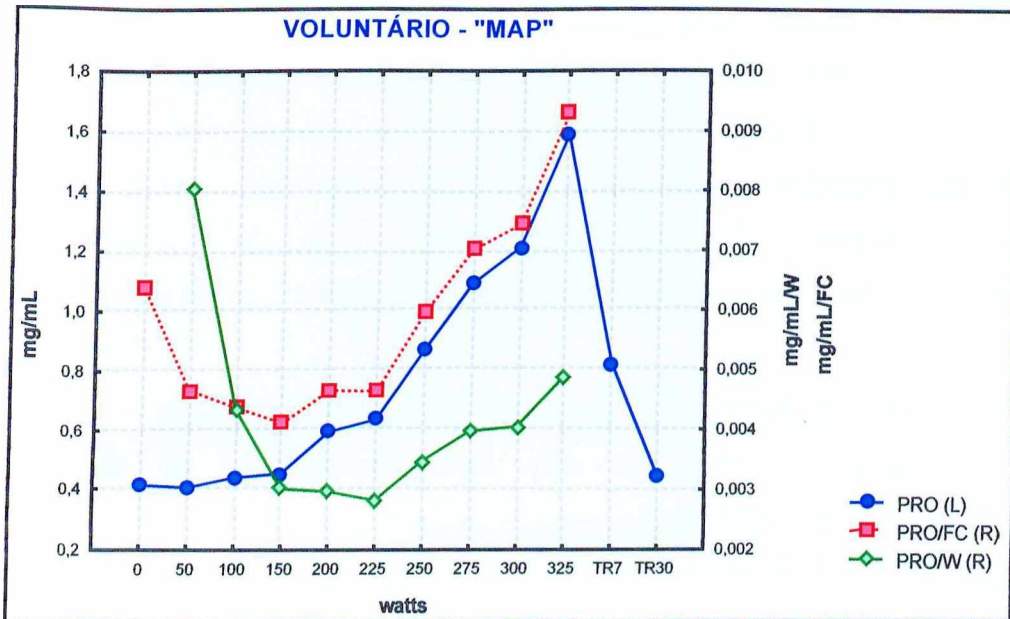
Nestes gráficos podemos observar os limiares AT (225W). A concentração de lactato sem divisão (LSG) e dividida tanto pela FC (LSGFC) quanto pelo W (LSGW).

Figura - 13- Limiares AT, AT/W e AT/FC.



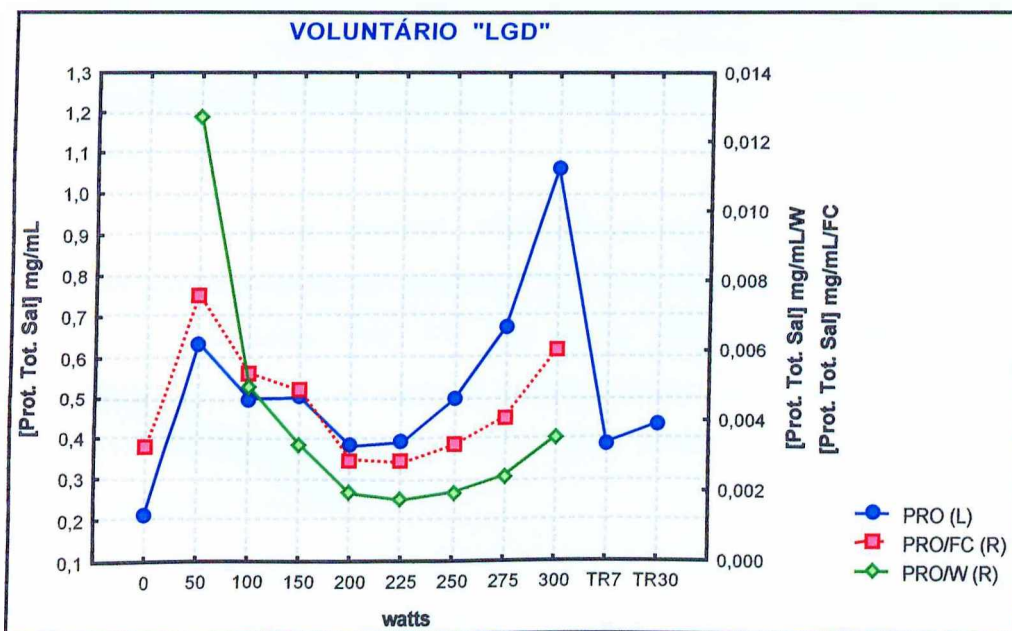
Nestes gráficos podemos observar os limiares AT (225W). A concentração de lactato sem divisão (LSG) e dividida tanto pela FC (LSGFC) quanto pelo W (LSGW).

Figura - 14 Limiares PAT, PAT/W e PAT/FC



Nestes gráficos podemos observar os limiares PAT (225W). A concentração de proteína total salivar sem divisão (PRO) e dividida tanto pela FC (PROFC) quanto pelo W (PROW).

Figura - 15. Limiares PAT, PAT/W e PAT/FC



Nestes gráficos podemos observar os limiares PAT (225W). A concentração de proteína total salivar sem divisão (PRO) e dividida tanto pela FC (PROFC) quanto pelo W (PROW).

2.5 DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos a variação de proteína total salivar da saliva total durante um exercício de cargas crescentes e obtivemos alta correlação com a variação da concentração de lactato sanguíneo, definindo um limiar anaeróbico de proteína total salivar (PAT). A base fisiológica deste estudo é a modulação do sistema nervoso autônomo (SNC), principalmente simpático, nas glândulas salivares e a relação adrenérgica (catecolaminas) com o limiar de lactato.

Nossos resultados mostram uma alta correlação entre o PAT e o AT (Tab. 8). A explicação para esta correlação baseia-se nos dados já demonstrados sobre a relação do limiar anaeróbico de lactato (AT) com o de catecolaminas (Th_{ca}) (GREEN, et al., 1983; MAZZEO e MARSHALL, 1989). Além disso, esta correlação foi também relatada entre limiar de lactato plasmático com biomarcadores salivares do limiar anaeróbico (Th_{sa}) (atividade da amilase ou eletrólitos ou os dois combinados) (CHICHARRO et al., 1994 e 1998; CALVO et al., 1997). Sabe-se também que a atividade adrenérgica modula a produção e secreção de proteínas pelas glândulas salivares (SCHNEYER, 1977; DENNISS e YOUNG, 1979; NEDERFORS e DAHLÖF, 1992).

Em nossos estudos, observou-se que alguns voluntários retornaram suas concentrações de proteína total salivar a níveis de pré-exercício até 30 minutos pós-teste (Tab. 11). Em contra partida, no estudo de Walsh et al., (1999) evidenciou-se que os valores desta concentração, só retornaram a níveis de pré-exercício 2,5 horas após o término do teste, sendo esse um exercício submáximo.

Em relação aos quatro voluntários que tiveram os limiares diferentes, em especial aos dois que tiveram os limiares de lactato (LSG, LSG/W e LSG/FC) diferentes, sugerimos uma não adequação do teste para estes quatro voluntários, pois ou o amento da carga ou o tempo dos estágios deveriam ser diminuídos. Os voluntários (com limiar igual a 100 e 150W) entre aqueles onze

com limiares idênticos, provavelmente tem seus limiares reais respectivos muitíssimo próximo do mesmo valor. Assim, as correlações entre o PAT e AT, podem ser maiores que as mostradas neste artigo (Tab. 8).

A definição de limiar anaeróbio, tanto para o AT quanto para o PAT, que não foi somente baseada em Wasserman, (1986) mas também em Villiger et al., (1995) e Kiss e Lima, (1999), foi neste estudo proposta pois, ao compararmos os limiares da concentração de lactato ou proteína total salivar, dividida pela intensidade de exercício correspondente, notamos que alguns limiares estavam subestimados em um estágio (intensidade em watts) ou em mais de um (intensidade em média da frequência cardíaca). Uma hipótese para isso é que no caso da carga (intensidade de exercício) em watts, a diferença entre o estágio subestimado e o seguinte foi mínima e no caso da média da frequência cardíaca (mFC), quase sempre o estágio de limiar estava em algum estágio inicial, pois a carga em W tem seu aumento quase que linearmente, enquanto que a frequência cardíaca (FC) tem a média dos valores numéricos dos primeiros estágios (em repouso igual a $66 \pm 3,15$; 1º estágio igual a $93,16, \pm 7,16$; 2º estágio igual a $106,06, \pm 8,33$), maior que a da carga em W (repouso igual a 0, 1º igual a 50W, e 2º igual a 100W) (Tab. 10).

Realizamos os testes deste trabalho na parte da tarde (15-17:30), já que a concentração de proteína total sofre somente uma pequena variação durante o dia (07:00 as 20:00 horas) (RANTONEN e MEURMAN, 2000). Além disso, na parte da manhã os voluntários teriam que fazer um aquecimento mais longo, o qual pode ter um impacto na resposta ventilatória e na avaliação da percepção de esforço (MARTIN; DOGGART; WHYTE, 2001).

Em relação a dosagem da proteína total salivar, utilizou-se o método de Bradford. De acordo com este trabalho a leitura da absorbância deve ser feita no intervalo recomendado (5-20 minutos). Desse modo, realizou-se com bastante critério a leitura das amostras entre 10'20'' a 10'30''. O controle do tempo nesta dosagem possibilitou alcançarmos resultados precisos e confiáveis. Este método também se mostrou muito usual, em termos de

simplicidade e rapidez de execução, e sua escolha foi definida mesmo havendo indicação na literatura de que a dosagem de proteína pelo método de biureto tivesse maior precisão (JENZANO et al., 1986).

Um fator positivo a ressaltar é referente a análise de proteína total da saliva, que tem custo financeiro muito menor em relação à do lactato sanguíneo, tanto na dosagem como na manutenção dos respectivos equipamentos. Além disso, diversas vantagens do uso da saliva para diagnóstico são consideradas, tais como, aceitabilidade (não-invasiva, sem dor, menor recusa), conveniência (coleta própria, coleta barata, rápido e simples, sem precaução com assepsia), versatilidade (populações de difícil alcance, por exemplo, usuário de drogas e grandes grupos) (PARRY, 1993) e ainda a saliva é considerada de biosegurança de classe I, de acordo com o Centro de Doenças do Estados Unidos, isto significa maior segurança na sua manipulação (SHIRTCLIFF et al., 2001).

Com a alta correlação (Pearson) dos resultados estatísticos, superposições dos intervalos de confiança das médias e a diferença não significativa (t-student) entre os limiares anaeróbicos de lactato (AT) e de proteína total salivar (PAT), podemos concluir que o AT está fortemente correlacionado ao PAT, sendo este um novo método não invasivo de se mensurar o limiar anaeróbico.

2.6 AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia (FAEFI e INGEB) pelo apoio na realização das análises e nos testes (Em especial ao Laboratório de Fisiologia da Educação Física-UFU). A CAPES pelo apoio de bolsa de mestrado. A Romeu P. M. S., Luciana D. R., Cibele L. A., Aníbal M.M. N., pelo apoio na coleta e análise das amostras e Ismair T. R., pelo suporte computacional, à Márcia R.S.B. e Luiz C.V.S.Jr pelo apoio com a escrita do artigo.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Biding. **Protein Assay By Dye Biding**. p.248-54, Jan, 1976.
 2. CALVO, F.; CHICHARRO, J.L.; BANDRÉS, F.; LUCÍA, A. PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L.L.; VAQUERO, A .F.; LEGIDO, J.C. (). Anaerobic threshold determinatin with analysis of salivary amilasy. **Can. J. Appl. Physis**. v.22, nº6, p.553-561, 1997.
 3. CHICHARRO, J.L.; LUCIA, A.; PEREZ, M.; VAQUERO, A.F.; URENA, R. Saliva composition and exercise. **Sports Med**. v.26, nº1, p.17-27, Jul, 1998.
 4. CHICHARRO, J.L.;LEGIDO, J.C.; ALVARES, J.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; GAMELLA, C. Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. **Kur- J.Appl Phys**. v.68, p.214-218, 1994.
 5. DAWES, C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. **J Physiol**. v.320, p.139-48, Nov, 1981.
 6. DENNISS, A.R.; YOUN, J.A. Modufication of salivary duct eletrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. **Pflügers Arch**. v.376, p.73-80, 1978.
 7. GLEIN, G.W.; ZABETAKIS, P.M.; DEPONQUALE, E.E.; MICHELIS, M.F.; NICOLAS, J.A. Plasma osmolority, volume and renin activity at the "anaerobic thrashold". **J.Applay Physiol**. v.52, p.991-994, 1984.
 8. GREEN, H.J.; HUGSON, R.L.; ORR, G.W.; RANNEY, D.A. Anaerobic threshold, blood lactate and muscle metabolites in prograssive exercise. **J Appl Physiol**.v.54,10032-10038, 1983.
 9. GUILBAULT, G. G.; PALLESCHI, G. Non-invasive biosensors in clinical analysis. **Biosensors & Bioelectronic**, nº10, p.379-392. 1995.
 10. JENZANO, J.W. et al. Comparison of five tecniques for determination of protein content in mixed human saliva. **Analytical Biochemistry**. North Carolina, v.159, p.370-376, Jul, 1986.
 11. KISS, M.A.P.D.; Lima,J.R.P. Limiar de variabilidade da freqüência cardíaca. **Atividade física & Saúde**. v.4: n.º 1, 1999.
 12. KIVELÄ, J. et al. Salivary carbonic anhydrase isoenzime VI. **Jornal of Physiology**. Parolannummol/Li, Finlandia, v.520; p.315-320, nº2, Oct, 1999.
 13. LEHMANN, M.; SCHIMID, P.; KEUL, J. Plasam catecholamines and blood lacteate accumulation during incremental exaustive exercise. **Int. Jornal of Sports Med**. v.6, p.78-81, 1985.
-

14. MARTIN, L.; DOGGART, A.L.; WHYTE, G.P.; Comparison of physiological responses to morning and evening submaximal running. *J Sports Sci.* v.19, nº12, p.969-976, Dec, 2001.
15. MAZZEO, R.S.; MARSHALL, P.M. Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. *J. Appl. Physiol.* v.67, p.1319-1322, 1989.
16. MINAGUCHI, K.; BENNICK, A. Invited Review. Genetics of Human Salivary Proteína. *J. Dent. Res.* Chiba City, v.689, nº1, p.2-15, Jan, 1989.
17. NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Science*, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.72-77. Sept, 1993. Número especial.
18. NEDERFORS, T.; DAHLÖF, C. Effects of the of beta-adrenoceptor antagonists atenolol and propranolol on human whole saliva flow rate and composition. *Acta Oral Biology.* v.37, p.579-584, 1992.
19. PARRY, J. V. Simple and Relible Salivary Tests for HIV and Hepatitis A and B Virus Diagnosis and Surveillance. *Annals of the New York Academy of Science*, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.216-233, Sept, 1993. Número especial.
20. PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD, H.; JENSEN, M.; KRZYWKOWSKI, K.; OSTROWSKI, K. Exercise and immol/Lune function: effect of ageing and nutrition. *Proc Nutr Soc.* v.58, nº3, p.733-42, Aug, 1999.
21. PEDERSEN, B.K.; TOFT, A.D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med.* v.34, nº4, p.246-51, Aug, 2000.
22. RANTONEN, P.J.; MEURMAN, J.H. Correlations between total protein, lysozyme, immol/Lunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. *Acta Odontol Scand.* Oslo, v.58, nº4, p.160-5, Aug, 2000.
23. SCHNEYER, L.H. Sympathetic control of Na, K transport in perfused submaxillary main duct of rat. *Am J. Physiol.* v.230, p341-345, 1977.
24. SHIRTELIFF, E.A.; GRANGER, D.A.; SCHWARTZ, E.; CURRAN, M.J. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immol/Lunoassay results, *Psyconeuroendocrinology.* Estados Unidos, v.26, p.165-173, Apr, 2001.
25. VILLIGER, B.; EGGER, K.; LERCH, R.; PROBST, H.; SCHNEIDER, W.; SPRING, H.; TRITSCHLER, T. *Resistência.* Livraria Santos ed.ltda. 1ª ed. 1995.
26. WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. *J Sports Sci.* v.17, nº2, p.129-134, Feb, 1999.

-
27. WASSERMAN, K. The anaerobic threshold measurements to evaluate exercise performance. **American Review Respiration Disease**. v.129, p.35-40, 1984.
 28. WASSERMAN, K.; McLLORY, M.B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal Cardiology**. v.14, p.844-852, 1964.
 29. WASSERMAN, K.; HANSEN, J.E.; SUE, D.Y.; WHIPP, B.J. Principles of exercise testing and interpretation. **Lea & Febiger**, Philadelphia, 1986.
 30. YOUNG, J.A.; VAN LENNEP, E.W. Secretion of salivary and salt gland. In: GIEBISCH, G., TOSTESON, D.C; USSING, H.H. Editors **Membrane transport in biology**, Berlin; **Springer-Verlag**, p.563-74, 1979.
-

3 CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO NO SALIVAR DURANTE EXERCÍCIO FÍSICO EM CICLOERGÔMETRO.

3.1 RESUMO

A concentração de óxido nítrico (NO) sangüíneo é aumentada durante um exercício físico intenso, e esta concentração pode ser refletida na saliva. Até este estudo não foi descrita nenhuma relação de NO salivar com limiar anaeróbico (AT) ou limiar anaeróbico de proteínas totais salivares (PAT) e atividade da amilase salivar, sendo estes os objetivos deste trabalho. Realizou-se um teste em cicloergômetro com homens jovens saudáveis, não fumantes com idade (anos): $\bar{Y}=23,5$, $s=5,14$; altura (m) $\bar{Y}=1,78$, $s=0,083$ e peso (kg) $\bar{Y}=72,4$ $s=4,62$, iniciando com 50Watts(W) e aumentando de 50 em 50 até 200 W, após isto os aumentos eram de 25 em 25W. Identificou-se dois padrões (1º $n=7$ e o 2º $n=4$) da variação da concentração de NO durante o exercício. Encontrou-se três características comuns entre os dois padrões: (1ª) mudança brusca na concentração de NO para cima ou para baixo, justamente no ponto de limiar (AT ou PAT), (2ª) no último estágio a concentração de NO foi menor que no anterior ($p<0,005$); (3ª) até 30 minutos após o término do exercício a concentração de NO, volta a subir, ficando acima dos níveis de pré-exercício. Assim nossos resultados sugerem que o possível aumento da concentração de catecolaminas durante o exercício pode se dar pela necessidade de haver uma maior vasoconstrição; que pode haver uma possível regulação recíproca entre NO e sistema adrenérgico e que NO seja um biomarcador da exaustão física e um dos responsáveis por ela. Esses dados precisam ser repetidos, pois o "n" pode não ser adequado.

Palavras Chaves: Óxido Nítrico, Exercício, Limiar anaeróbico, Saliva, amilase salivar.

3.2 INTRODUÇÃO

A análise de biomarcadores salivares representa uma importante alternativa de monitoramento do exercício físico. A saliva tem sido utilizada como um fluido marcador do estado fisiológico normal, fisiopatológico (GUILBAULT e PALLESCHI, 1995) e do exercício (RANTONEN e MEURMAN, 2000; WALSH et al., 1999; CHICHARRO et al., 1994 e 1998; CALVO et al., 1997). Pesquisadores analisaram alguns destes "biomarcadores" salivares durante o exercício (humanos), tais como, IgA, proteína total, alfa amilase salivar, eletrólitos (RANTONEN e MEURMAN, 2000; WALSH et al., 1999; CHICHARRO, et al., 1994 e 1998; CALVO et al., 1997). Entre eles, nota-se a presença do óxido nítrico (NO), o qual está aumentado durante o exercício físico. O NO salivar que se encontra na forma de nitrato e nitrito, pode refletir a concentração sanguínea. (PANOSSIAN et al., 1999).

Os mecanismos controladores do fluxo sanguíneo no músculo esquelético durante o exercício são complexos e envolvem controle neural, metabólico, endotelial, miogênico e controle da bomba muscular. Estes mecanismos modulam o fluxo sanguíneo, via efeito na pressão de perfusão e no calibre da resistência dos vasos. Tradicionalmente o calibre dos vasos sugere um balanço diretamente mediado pela vasodilatação, e pela produção de metabólitos do músculo em exercício e ativação simpática via estimulação metabólica e mecanorreceptores. O NO deriva tanto do endotélio (NOS endotelial do tipo III) como do músculo esquelético (NOS neuronal, tipo I), podendo assim, desenvolver um importante papel na manutenção da perfusão tecidual demandada (KINGWELL, 2000).

A hiperemia induzida pelo exercício, através da produção de NO no endotélio dos vasos, pode ser explicada pelo mecanismo do atrito de cisalhamento ("shear stress") e pelo da liberação de acetilcolina vascular. O primeiro (atrito de cisalhamento), que é determinado pelo fluxo e viscosidade sanguínea, consiste num estímulo bem estabelecido para explicar o aumento do nível de Ca^{+} e liberação do NO endotélio vascular. Este se difunde subjacentemente para células do músculo liso vascular, onde ele ativa a

guanilato ciclase para produção de cGMP a partir de GTP e finalmente causa a vasodilatação (SEGAL, 1994). Assim, a dilatação de microvasos em resposta ao acúmulo de metabólitos vasodilatadores, cria um gradiente de pressão, que estimula a dilatação fluxo mediada na circulação arterial. Isto ocorre, pois NO é liberado no endotélio por estímulo do atrito de cisalhamento (SEGAL, 1994), o qual aumenta durante o exercício físico em humanos (TAYLOR et al., 2002). O segundo mecanismo explica-se através da liberação de acetilcolina da junção neuromuscular, que pode difundir-se para o endotélio vascular, ativando os receptores muscarínicos liberando assim NO. Em resumo, é sugerido que ou o NO desenvolve um papel à resposta de hiperemia ao exercício ou há uma redundância no mecanismo vasodilatador, pois o NO não tem um papel obrigatório na hiperemia do exercício se outros mecanismos são funcionais. A determinação destas duas possibilidades será difícil, mas pode ser possível com a inibição de outro mecanismo dilatador metabólico principal, incluindo adenosina, prostaciclina e canais de K^+ ATP (KINGWELL, 2000).

Tem-se evidenciado que o NO é um importante regulador hemodinâmico e metabólico durante a atividade física (BALON e NADLER, 1994). Recentemente mostrou-se que, durante exercício físico exaustivo a concentração de NO aumentou no sangue e na saliva, podendo o NO salivar ser utilizado tanto na avaliação da carga física, quanto no efeito protetor contra o estresse de um adaptogen (PANOSSIAN et al., 1999). Em outro trabalho, mostrou-se que num exercício de 45min até a exaustão houve aumento da atividade da NOS endotelial e da neuronal em ratos (ROBERTS et al., 1999).

O tratamento do músculo com fornecimento de NO pode inibir a atividade da actomiosina ATPase e reduzindo a força do músculo esquelético (PERKINS et al., 1997), mas é difícil imaginar como as concentrações de NO ou s-nitrosotiol (SNO) podem ativar esse efeito (STAMLER e MEISSNER, 2001). Sabe-se que a atividade da NOS tem sido mostrada inibir a respiração mitocondrial no músculo esquelético, pois o NO pode influenciar na respiração celular ou na homeostasia do cálcio. Isto pode ocorrer sob condições fisiológicas normais, ou então, em células expostas a força nitroativa (KING et

al., 1994; KOBZIK et al., 1995). Sabe-se que os doadores de NO aumentam a síntese de cGMP no músculo esquelético (ABRAHAM et al., 1998; KOBZIK et al., 1994). Em um experimento com camundongos mostrou-se que suas fibras mais rápidas (*mdx*), tiveram cGMP aumentado bem abaixo das fibras controle, com estimulação elétrica, possivelmente dada a deficiência de nNOS nas *mdx* (LAU et al., 1998).

Num experimento em cavalos que observou a relação entre lactato e NO, mostrou que uma inibição não específica das isoformas de NOS durante o exercício, aumentou a concentração de lactato plasmático, no entanto o mecanismo continua incerto (MILLS et al., 1999). Assim, potencialmente o NO afeta o controle metabólico durante o exercício, via múltiplos mecanismos, incluindo a preservação intracelular do músculo esquelético do estoque de energia pela captação de glicose, inibição da glicólise, da respiração mitocondrial e da quebra da fosfocreatina (KINGWELL, 2000). No entanto, a inibição da NOS, não mostrou afetar a captação de oxigênio durante o exercício (BRADLEY et al., 1999).

Nas glândulas salivares a estimulação simpática (via noraepinefrina) leva a alta secreção de proteínas enquanto que a parassimpática (via acetilcolina) leva a produção de fluidos (SCHNEYER, 1976; DENNISS e YOUNG, 1978). A via da L-arg/NO desenvolve um papel modulador no controle colinérgico tanto do fluido salivar como na secreção da amilase (LOHINAI et al., 1999). A localização neural, em ratos e em suínos, da NOS sugere que o NO pode participar na regulação tanto do fluxo sanguíneo quanto da secreção das glândulas salivares. Sabe-se que o NO controla o "tônus vascular" nas glândulas salivares em repouso e após estimulação do nervo autônomo (LOHINAI et al., 1999). Uma alta concentração de alfa-amilase é considerada o melhor indicador da secreção salivar evocada pela atividade adrenérgica (ANDERSON et al., 1984).

A saliva que é excretada em resposta à estimulação adrenérgica, geralmente tem um alto conteúdo orgânico, incluindo elevados níveis de alfa-

amilase, comparada com a saliva excretada pela estimulação colinérgica (CHICHARRO et al., 1998). O efeito modulatório da secreção de fluido e amilase salivar pode envolver a supressão da atividade simpática, pois a vasoconstricção periférica inibida pelo NO é um importante elemento controle da vasodilatação *in vivo* (ZANZINGER; CZACHUSRSKI; SELLER, 1994). Uma alta concentração de α -amilase é considerada o melhor indicador da secreção salivar evocada pela atividade adrenérgica (ANDERSON et al., 1984). Ela pode ser um mais direto e um mais simples, ponto final da atividade de catecolaminas do que mudanças do no batimento cardíaco (CHATTERTON et al., 1996).

Segundo CLARK et al., (1998) há dois tipos de vasoconstricção a do tipo "A" e do "B". O tipo A e B aumentam a pressão de perfusão, para assim chegar mais sangue nos vasos, mas somente o tipo A causa um aumento adicional da entrega do sangue (NEWMAN et al., 1996). Este tipo A é chamado assim, pois concomitante com sua atividade vasoconstrictora, aumenta uma variedade de trocas metabólicas, incluindo produção de oxigênio, efluxo de lactato, de glicerol, de urato e de uracil, tal como produção de glicose insulina-mediada. Ela inicia-se quando o Ca^{++} não se encontra na perfusão média ou quando o O_2 é substituído por N_2 . Em adição, os vasodilatadores que liberam o NO, bloqueiam os canais de Ca^{++} ou levam à produção do AMP cíclico na vasculatura do músculo liso, o qual bloqueia tanto a atividade vasoconstrictora como a metabólica. Assim ela se caracteriza por uma proporcionalidade entre vasoconstricção e aumento do metabolismo. O tipo B difere do tipo A, dado que pode iniciar com baixas quantidades de Ca^{++} ou quando o O_2 é substituído por N_2 durante perfusão dos membros, não é totalmente bloqueado por adição de vasodilatadores e reduz uma variedade de trocas metabólicas. No entanto, os dois tipos de vasoconstricção aumentam a perfusão no músculo em repouso (CLARK et al., 1998).

Embora o NO seja amplamente estudado em todos seus aspectos, em especial suas relação com o exercício, não se havia estudado ainda nenhuma relação entre a concentração de NO salivar comparando com limiar anaeróbico

(AT ou PAT) e atividade da amilase salivar. Assim o objetivo deste trabalho é avaliar a variação da concentração de óxido nítrico salivar, durante exercício com incremento de carga em cicloergômetro, e comparar a concentração de lactato sangüíneo, proteína total salivar e atividade da amilase salivar com a concentração de NO salivar.

3.3 MÉTODO

Previamente o projeto foi enviado e aprovado pelo conselho de ética da Universidade Federal de Uberlândia.

3.3.1 VOLUNTÁRIOS

Após carta informativa a várias pessoas, selecionou-se 11 homens saudáveis não fumantes (idade em anos: 23,5, +/-5,14; altura em metros:1,78, +/-0,083; peso em kg:72,4, +/-4,62), os quais assinaram um termo de consentimento conforme determina o Conselho Nacional de Saúde do Brasil, resolução 2/01. Pediu-se aos voluntários (quatro ciclistas, três jogadores de basquete e quatro praticantes de atividade física não específica) que não fizessem esforço pesado ou moderado, no dia anterior ao mesmo, que sua última refeição fosse pelo menos duas horas antes do teste, que ingerissem bastante água no dia do teste e no dia anterior, que não ingerissem qualquer substância estimulante (café, guaraná...), ou contendo corantes e que a higiene bucal fosse feita corretamente.

3.3.2 TESTE CICLO ERGOMÉTRICO

Todos os testes no ciclo ergômetro (Ergofit 167, German) foram realizados entre 15:30 e 17:30 horas, com a temperatura da sala sendo mantida em 25°C. Todos os voluntários ingeriram +/- 400mL água, 30 minutos antes do teste e realizaram o teste com os pés fixados no pedal através de sapatilhas próprias ou amarrados. Previamente os voluntários realizaram alongamento e um breve aquecimento de dois minutos (sem carga na bicicleta). Sua frequência cardíaca foi mensurada com um frequencímetro com interface (Polar, S610). O teste iniciou com 50 Watts (W), aumentando de 50

em 50W até 200W, em seguida aumentando de 25 em 25W até a exaustão, com duração de 3min por estágio, sendo a frequência de rotação, no cicloergômetro, sendo realizada estritamente entre 58 e 62 rpm.

3.3.3 COLETA DA SALIVA

A saliva estimulada, por goma de mascar (trident-menta), foi coletada pelo método de cuspe segundo Navazesh, (1993). Dez minutos antes do teste físico, coletou-se saliva estimulada durante os primeiros cinco (05) minutos (saliva basal), onde a saliva dos dois (02) primeiros minutos foi rejeitada e a dos três (03) restantes era coletada numa proveta graduada. Logo antes desta coleta o voluntário enxaguou a boca várias vezes com água desionizada, para limpeza de debris celulares e outros. Avisava-se o voluntário 30 segundos antes de cada mudança de estágio, para que engolisse a saliva e começasse a mastigar o chiclete. Começava-se a coleta da saliva 10 segundos antes de terminar o estágio. A saliva era colocada em mini-tubos pré-resfriados (4°C) durante um tempo máximo de três horas, centrifugada a 14.000g descartado-se o pélet e congelado o sobrenadante à -20°C. A proteína total foi mensurada (saliva pura) pelo método de Bradford, M.M.(1976) sem HCl, com as amostras sendo lidas entre 10'20" e 10'30", após se colocar o reagente de Bradford. A concentração de NO salivar (saliva pura) foi determinada conforme método de Griess (Granger, et al., 1995). E a atividade da amilase salivar (saliva 200x diluída) foi realizada por dosagem por cloronitrofenol (kit Cat. 225 da analisa). A sigla PRO significa proteína total saliva sozinha. A definição de limiar anaeróbico de proteína total salivar (PAT) está de acordo com a definição do capítulo 2 desta dissertação.

3.3.4 COLETA DO SANGUE

O sangue (25µL) foi coletado com capilares heparinizados e colocados em mini-tubos com 50µL de fluoreto de sódio e armazenados no gelo por no máximo 3 horas e congelado à -20°C. O lactato sangüíneo foi analisado por

método eletro-enzimático (lactímetro YSI 1500 Sport da Yellow Springs). As sigla LSG significa lactato sanguíneo sozinho. A definição de limiar anaeróbico base foi a de Wasserman, (1986).

3.3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o teste de "t" para amostras dependentes, para identificar diferenças entre as médias de porcentagem da atividade da amilase dos voluntários antes durante e pós-exercício.

3.4 RESULTADOS

Após a realização do teste máximo em cicloergômetro, e analisou-se a concentração de lactato sangüíneo, a concentração de proteína total, a atividade da amilase e concentração de NO salivar. Determinamos graficamente os pontos de limiar anaeróbicos, tanto o do lactato (AT) como o da proteína total salivar (PAT), dos onze indivíduos. Realizamos as comparações gráficas das curvas de lactato e de proteína com a variação de NO durante o exercício. Além destas, realizamos também comparações entre o NO com a atividade da amilase salivar.

Pode-se notar dois padrões de variação de NO durante a atividade física. O primeiro (Fig. 17 e 19) com 7 voluntários, a concentração de NO do estágio de limiar anaeróbico (AT ou PAT) para o estágio seguinte, tem uma queda (geralmente brusca) e um aumento não linear até o penúltimo estágio, voltando a cair no último. A concentração de NO até 30 minutos pós-teste, geralmente, aumenta acima da concentração basal (Tab. 15). No segundo (Fig. 16 e 18) com 4 voluntários: a concentração de NO do estágio de limiar anaeróbico (AT ou PAT) para o estágio seguinte, tem uma queda brusca e cai até o último estágio. A concentração de NO até 30 minutos pós-teste, geralmente, também aumenta acima da concentração basal (Tab. 15).

É interessante notar que os dois padrões (Fig. 16, 17, 18, 19) tiveram três pontos em comum: (1º) mudança brusca na concentração de NO aumentando ou diminuindo, justamente no ponto de limiar (AT ou PAT), (2º) no último estágio a concentração de NO é menor que no anterior (Tab. 15), (3º) até 30 minutos após o término do exercício a concentração de NO, volta a subir, ficando acima dos níveis de pré-exercício (Tab. 15).

Em relação a estes padrões, observou-se que num dos voluntários do 2º padrão teve o caimento não no ponto de limiar, e sim no estágio seguinte. Em três voluntários não foi possível quantificar o NO no último estágio por insuficiência de amostras de saliva. Dois voluntários não tiveram um aumento

da concentração de NO após 30 minutos de teste em relação a sua concentração basal (Tab. 15).

A atividade da amilase, geralmente, seguiu um certo padrão (Fig. 20 e 21). A atividade da amilase no repouso (basal), geralmente, é menor que nos estágios durante o exercício. Com o início do exercício pode haver um aumento considerável (Fig. 20) ou não (figura 21). Ao chegar no estágio de limiar nota-se um aumento abrupto. A atividade da amilase no estágio de limiar, geralmente é um pouco maior que o do basal, elevando-se consideravelmente até o último estágio do exercício (Fig. 20 e 21).

Por falta de amostra do último estágio, não foi possível mostrar as porcentagens (relativo ao NO) dos voluntários 1, 2 e 4 (Tab. 16). Todos os voluntários tiveram, percentualmente, a atividade da amilase do estágio de limiar e do último estágio maiores que a basal. Com exceção do voluntário 9 que teve suas médias de porcentagem abaixo da basal em relação ao restante. As três médias de porcentagens foram diferentes entre elas para $p < 0,01$.

É interessante notarmos que no último estágio de exercício, enquanto o NO tem uma queda, a atividade da amilase chega ao seu máximo. Na recuperação acontece o contrário o NO sobe e a atividade da amilase cai.

Um dado importante que a ser mencionado, é a dificuldade de coletar a saliva no último estágio, dado tanto ao aumento visível da viscosidade da saliva como pela falta de saliva, propriamente dita.

As tabelas de 17-21 mostram dados pessoais (peso, altura, idade e tempo de exercício) e valores individuais, durante o teste, da concentração de lactato sanguíneo em mmol/L de proteína total saliva em mg/mL e de óxido nítrico em $\mu\text{mol/L}$ e a atividade da amilase salivar em U/L.

Tabela - 15

**COMPARAÇÕES DOS DOIS PADRÕES DE RESPOSTA DE NO
SALIVAR DURANTE O EXERCÍCIO EM CICLOERGÔMETRO COM
CARGAS CRESCENTES.**

Voluntários	% de ↑ ou ↓ da [NO], entre o estágio de limiar com o próximo	% de queda da [NO] do penúltimo estágio, em relação ao último	% de ↑ ou ↓ da [NO] 30min pós-teste em relação à [NO] basal.
-------------	--	---	--

Padrão de variação "1" [NO]

1	6,032		91,5
2	33,691		225
3	23,443	-3,947	-20
4	118,19		10
5	15,622	-14,737	24,5
6	45,098	-36,616	61,5
7	16,25	-43,7	101
Média	36,904	- 24,750)	70,500

Padrão de variação "2" [NO]

8	-11,054	-5,397	161
9*	-13,491	-13	159
10	+7,44*	-12,82	132
11	-31,142	-41,713	-38
Média	- 18,562	- 18,233	103,5

*Teve a queda no estágio seguinte ao do limiar, com a porcentagem igual à -11,504.

Tabela - 16

ATIVIDADE DA AMILASE SALIVAR DURANTE O TESTE				
Voluntários	% da atividade da amilase no estágio de limiar em relação ao basal.	% da atividade da amilase no último estágio em relação ao basal.	% ↑ ou ↓ da atividade da amilase 30min pós-teste em relação ao basal.	% ↑ ou ↓ da atividade da amilase do último estágio em relação aos 30min pós-teste.
1	129,6313	591,7266	-21,31294964	-86,702
2	108,9112	271,5489	-29,89846619	-74,185
3	133,3183	453,9119	2,945143885	-77,320
4	134,6455	431,8599	17,06422018	-72,893
5	166,5296		37,44860943	
6	142,5759	514,8893	-42,57588187	-88,847
7	156,0284	238,1987	-30,22191718	-70,706
Média	138,8058	417,0225	-10,91890176	-74,988
Padrão de variação "2" [NO]				
8	220,2459	746,8306	51,7479831	-79,681
9	74,64229	62,55962	-49,20508744	-18,806
10	178,8996	282,2339	241,1479302	20,874
11	104,951	144,8355		
Média	144,6847	309,1149	72,50434869	-13,915
Média Total	140,9435	373,8595	17,71395845	-60,91843

Tabela - 17

VALORES INDIVIDUAIS				
VOLUNTÁRIOS	PESO	ALTURA	IDADE	TEMPO TOTAL
RRC	75	1,75	29	27'40"
MAP	70,5	1,7	30	27'35"
LGD	70	1,75	23	24'15"
VPM	68,5	1,79	30	31'08"
LSB	82	1,88	20	22'03"
ACS	68,3	1,71	21	16'20"
WSJ	73,5	1,8	19	14'10"
WBO	73,5	1,8	19	13'30"
TVG	80,3	1,99	18	21'
RBM	68	1,76	19	16'15"
SRM	67,5	1,76	22	18'

Tabela - 18

VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO SANGÜÍNEO EM mmol/L.

Vol/ Est.	T00	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	TR7	TR30
RRC	1,62	1,8	1,29	1,59	2,73	3,42	5,85	5,49		15,66		13,68	6,48
MAP	2,25	1,47	1,41	1,5	1,71	1,68	2,46	3,51	6,69	8,94		9,27	4,74
LGD	0,54	0,66	1,11	1,29	1,44	3,24	5,76	9,36				7,2	3,84
VPM	0,69	0,84	0,81	0,87	1,14	1,38	2,13	2,4	4,08	4,08	11,16	10,56	5,28
LSB	1,80	1,71	1,68	2,52	3	4,92	6,78	11,04				11,49	4,02
ACS	0,96	1,32	1,83	3,84	7,2		13,56					14,37	9,87
WSJ	1,02	1,41	1,98	3	6,3	9,48						9	5,01
WBO	0,84	1,08	1,77	3,15	5,82	7,8						9,42	4,95
TVG	0,66	0,66	0,51	1,5	2,49	3,99	6	8,1				8,7	4,59
RBM	0,75	1,23	2,46	4,32	6,51	10,11	11,64					13,74	6,42
SRM	0,87	0,84	1,62	2,91	5,4	8,97	13,65					12,27	5,61

P.S.: A letra "T" significa teste e a numeração é os estágios do teste. Ex.: T06 significa o 6º estágio de teste. Lembrando que cada estágio tem uma duração de 3 minutos. A letra "R" significa recuperação pós-exercício.

As letras da 1ª coluna significam as iniciais de cada voluntário.

Tabela - 19

VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL SALIVAR EM mg/mL.

Vol/Est.	T00	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	TR7	TR30
RRC	0,467	0,572	0,488	0,526	0,702	0,843	1,112		1,353	1,488		1,536	0,539
MAP	0,41	4,014	0,434	0,448	0,588	0,63	0,864	1,087	1,21	1,587		0,819	0,43
LGD	0,215	0,636	0,5	0,502	0,383	0,392	0,494	0,671	1,061			0,389	0,435
VPM	0,628	1,426	1,412	1,192	1,151	1,006	1,107	1,262	1,609	1,782	2,14	1,276	0,53
LSB	0,424	0,629	0,674	0,527	0,652	0,766	1,02	1,621				0,838	0,289
ACS		1,133	1,273	1,44	2,055	2,368	2,693					2,456	1,692
WSJ	0,377	0,371	0,414	0,363	0,668	1,198						0,724	0,541
WBO	0,43	0,551	0,453	0,46	0,851	1,581						0,39	0,516
TVG	0,487	0,919	0,7	0,637	0,653	0,688	0,777	0,994				0,717	1,171
RBM	0,588	1,297	0,76	0,622	0,818	0,909	0,866					0,709	
SRM	0,381	0,436	0,407	0,463	0,452	0,647	0,039					0,204	0,198

P.S.: A letra "T" significa teste e as numerações são os estágios do teste. Ex.: T06 significa o 6º estágio de teste. Lembrando que cada estágio tem uma duração de 3 minutos. A letra "R" significa recuperação pós-exercício.

As letras da 1ª coluna significam as iniciais de cada voluntário.

Tabela - 20

VALORES INDIVIDUAIS DA ATIVIDADE DA AMILASE SALIVAR EM U/L.													
	T00	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	TR7	TR30
RRC	13,11	7,788	8,37	13,02	20	20,46	26,59		33,54	31,23		35,88	9,16
MAP	4,45	3,95	3,56	3,33	4,81	5,77	7,81	10,74	17,56	26,32		6,16	3,49
LGD	2,60	8,20	5,24	5,8	4,45	5,73	7,51	6,79	19,44			4,45	3,95
VPM	12,59	12,52	15,68	17,73	13,34	21,38	13,12	9,39	22,08	15,65	7,88	23,06	6,39
LSB	9,26	11,43	16,01	14,10	10,08	15,22	19,14	25,14				12,88	6,49
ACS	9,69	20,63	17,33	20,23	39,87	21,88	27,35					42,77	33,05
WSJ	4,45	5,11	5,93	11,10	4,81	20,2						8,76	4,58
WBO	6	9,85	7,51	8,07	11,96	25,9						4,09	7,02
TVG	8,66	16,34	12,09	11,53	9,09	9,47	11,99	12,55				6,85	
RBM	8,27	23,66	15,39	14,00	13,77	16,24						16,24	11,37
SRM	4,88	5,21	6	6,46	6,95	8,34	25,11					3,36	2,80

P.S.: A letra "T" significa teste e as numerações são os estágios do teste. Ex.: T06 significa o 6º estágio de teste. Lembrando que cada estágio tem uma duração de 3 minutos. A letra "R" significa recuperação pós-exercício.

As letras da 1ª coluna significam as iniciais de cada voluntário.

Tabela - 21

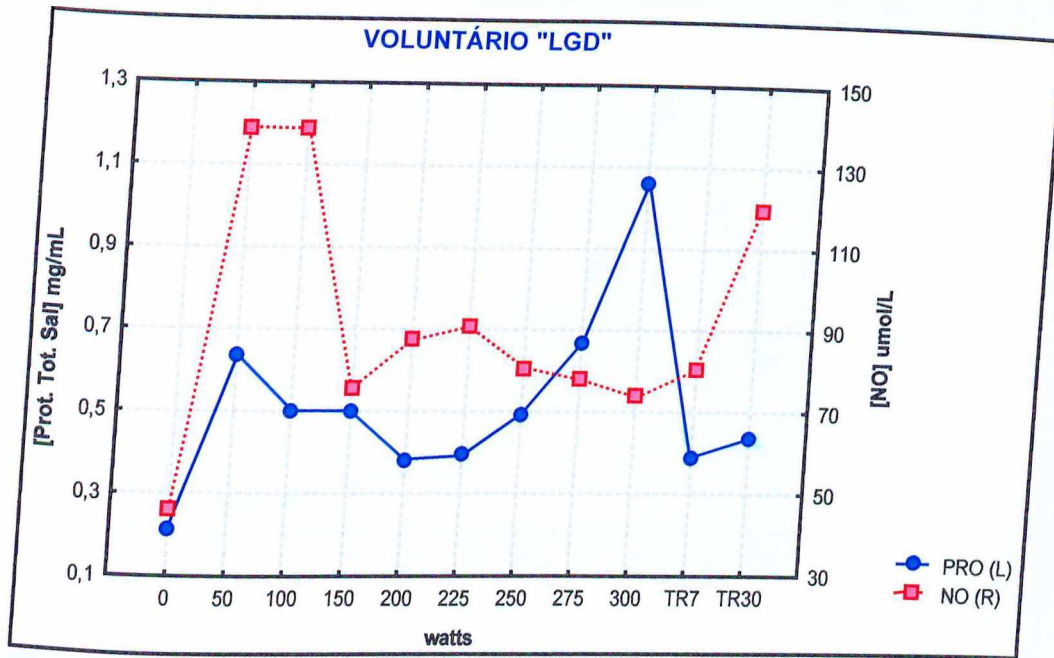
**VALORES INDIVIDUAIS DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO SALIVAR EM μM .**

	T00	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	TR7	TR30
RRC	69,96	131,60	92,18	141,22	116,16	122,63	142,58		138,65	96,52	286,72	142,17
MAP	35,35	148,74	105,01	93,20	138,28	126,06	133,67	198,17		169,79	91,70	68,08
LGD	46,26	138,92	138,78	75,52	87,31	90,69	80,67	77,82	73,62		80,26	119,96
VPM	63,71	241,45	220,57	265,62	252,92	238,04	227,94	200,36	173,33		154,36	230,40
LSB	17,98	37,64	59,21	66,99	55,11	73,68	151,22				39,14	58,52
ACS	151,03	347,39	397,16	426,72	377,63	329,22					278,36	351,86
WSJ		56,82	48,29	44,50	54,93	52,76					16,86	44,90
WBO	49,38	66,31	84,87	87,06	189,95						39,55	54,34
TVG	41,18	93,53	78,47	103,97	96,24	66,27	66,00	38,47			65,05	25,45
RBM	65,46	67,22	54,34	38,20	44,16	48,78	41,59				45,66	81,46
SRM	26,10	47,16	52,43	39,06	57,02	114,66	72,67				51,75	42,03

P.S.: A letra "T" significa teste e as numerações são os estágios do teste. Ex.: T06 significa o 6º estágio de teste. Lembrando que cada estágio tem uma duração de 3 minutos. A letra "R" significa recuperação pós-exercício.

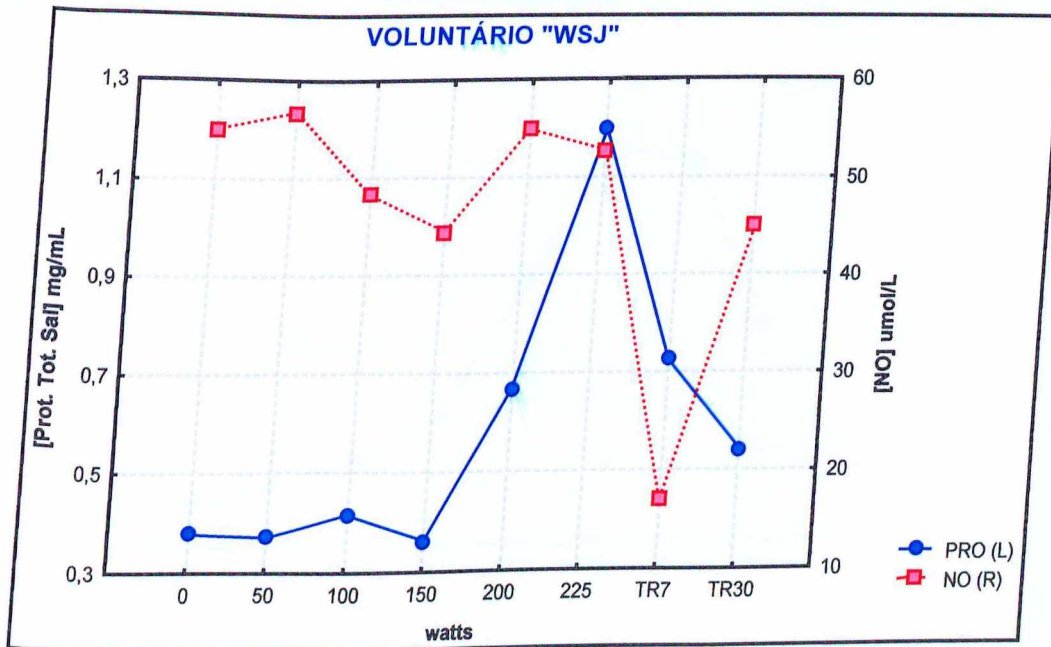
As letras da 1ª coluna significam as iniciais de cada voluntário.

Figura. 16. Comportamento do NO (Padrão 2) no limiar anaeróbico (PAT).



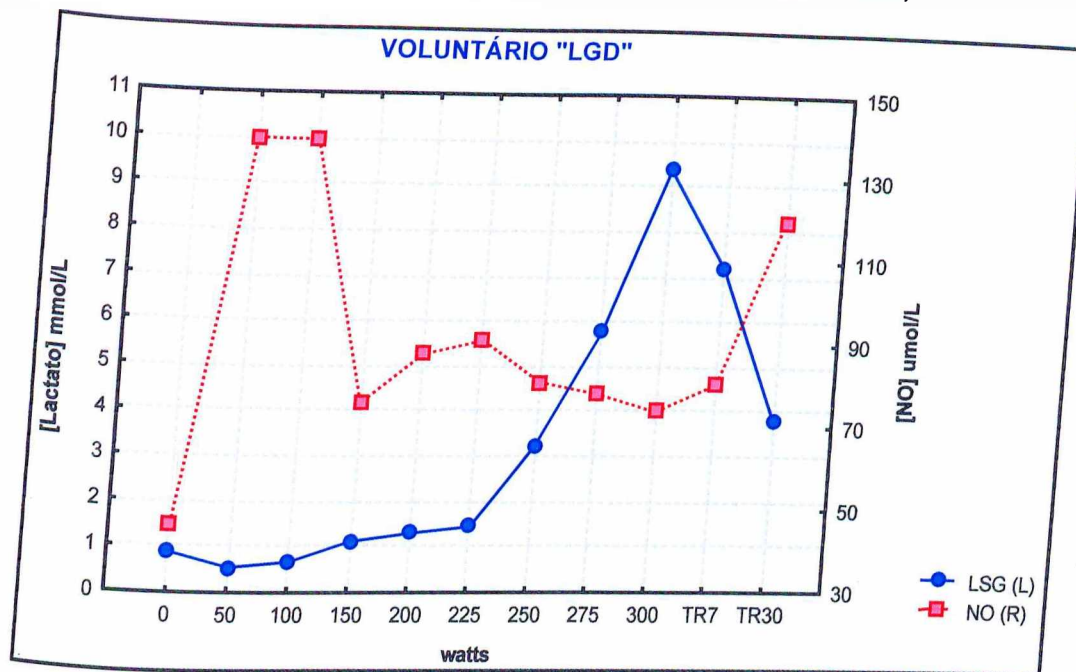
PRO: concentração de proteína total salivar em mg/mL; NO: concentração de nitrito e nitrato salivar em $\mu\text{mol/L}$; Podemos observar o PAT deste voluntário em 225W, no qual há uma queda da concentração de NO

Figura - 17. Comportamento do NO (Padrão 1) no limiar anaeróbico (PAT).



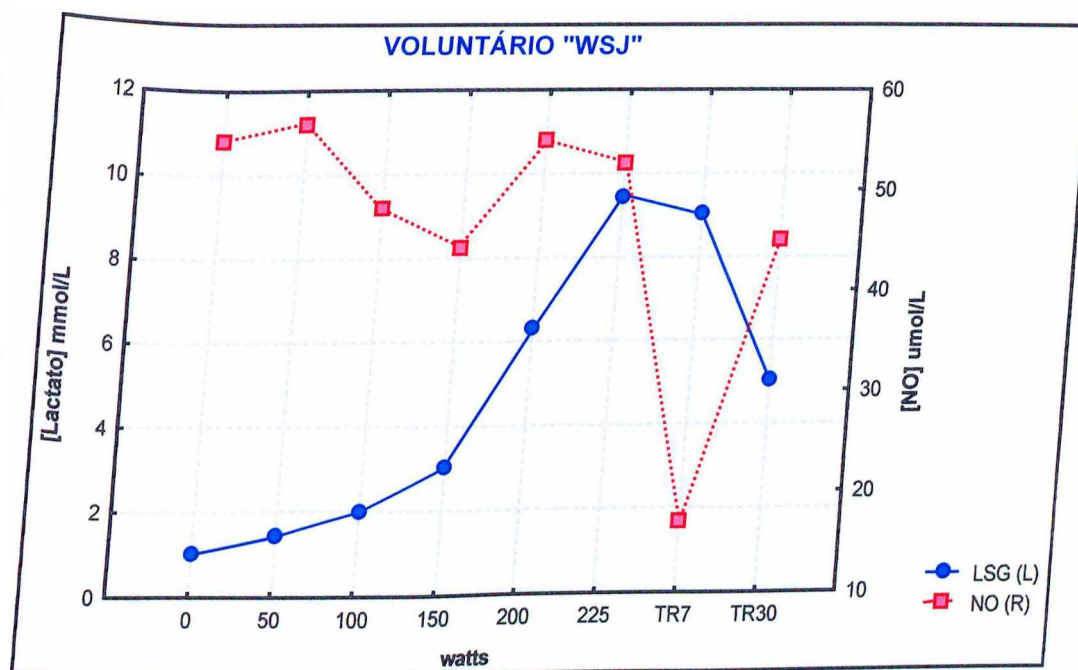
PRO: concentração de proteína total salivar em mg/mL; NO: concentração de nitrito e nitrato salivar em $\mu\text{mol/L}$; Podemos observar o PAT deste voluntário em 150W, no qual há uma queda da concentração de NO

Figura - 18. Comportamento do NO (Padrão 2) no limiar anaeróbico (AT)



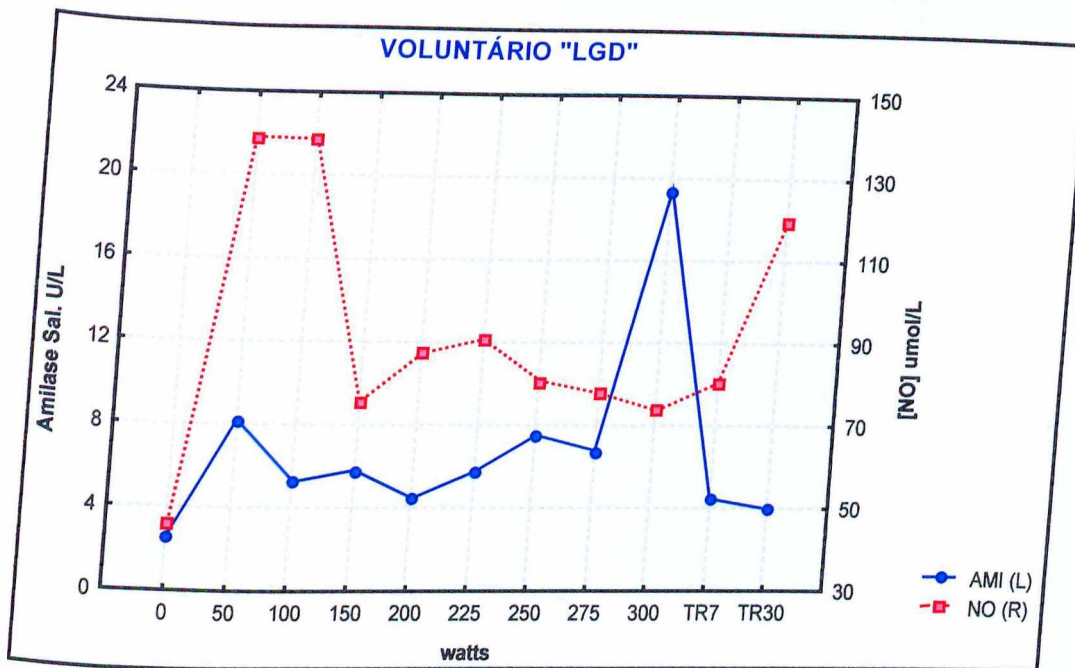
LSG: concentração de lactato sanguíneo em mmol/L; NO: concentração de nitrito e nitrato salivar em $\mu\text{mol/L}$; Podemos observar o AT deste voluntário em 225W, no qual há uma queda da concentração de NO

Figura - 19. Comportamento do NO (Padrão 1) no limiar anaeróbico (AT).



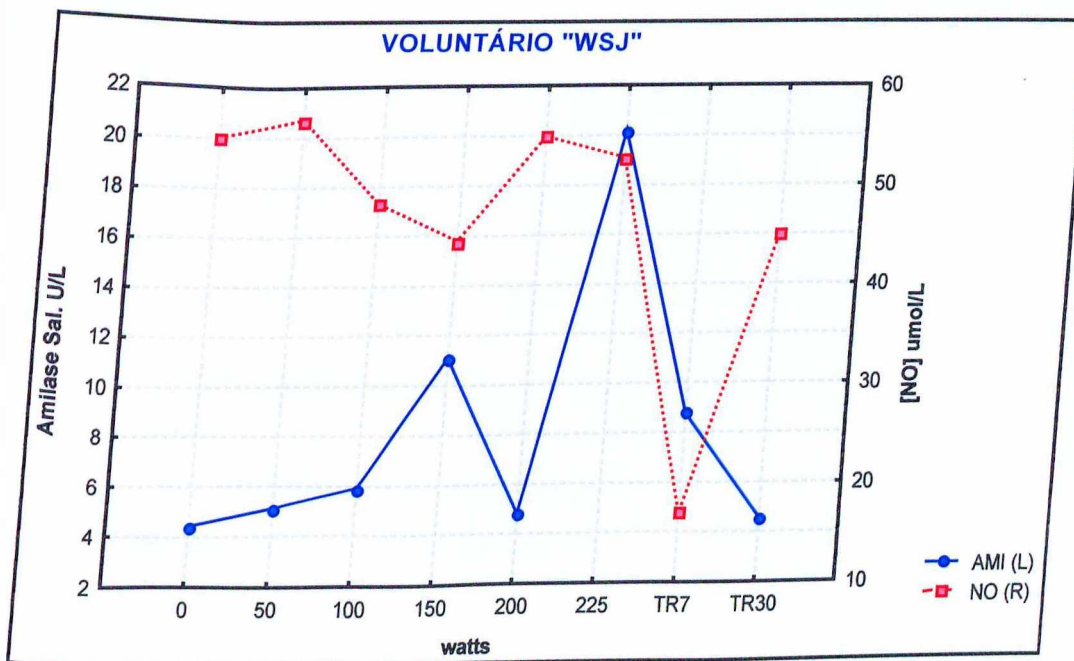
LSG: concentração de lactato sanguíneo em mmol/L; NO: concentração de nitrito e nitrato salivar em $\mu\text{mol/L}$; Podemos observar o AT deste voluntário em 150W, no qual há uma queda da concentração de NO

Figura - 20- Comparação do NO e da amilase no último estágio (Padrão 2).



AMI: atividade da amilase salivar em U/dl (UI); NO: concentração de nitrito e nitrato salivar em $\mu\text{mol/L}$; Podemos observar no último estágio, a concentração de NO sofrendo uma queda enquanto que a atividade da amilase chega ao seu pico máximo.

Figura - 21. Comparação do NO e da amilase no último estágio (Padrão 1).



AMI: atividade da amilase salivar em U/dl (UI); NO: concentração de nitrito e nitrato salivar em $\mu\text{mol/L}$; Podemos observar no último estágio, a concentração de NO sofrendo uma queda brusca enquanto que a atividade da amilase chega ao seu pico máximo.

3.5 DISCUSSÃO

A concentração de NO sangüíneo é aumentada durante um exercício físico intenso, e esta concentração pode ser refletida na saliva. Nossa proposta de estudo é observar se há alguma relação entre a concentração de NO salivar com limiar anaeróbico de lactato (AT) e limiar anaeróbico de proteínas totais salivares (PAT) e atividade da amilase salivar.

O NO (neuronal e endotelial) é responsável pela modulação do fluxo sangüíneo (KINGWELL, 2000), sendo importante regulador hemodinâmico e metabólico durante a atividade física (BALON e NADLER, 1994). Além disso, pode modular a secreção de fluido e amilase salivar, via inibição simpática da vasoconstrição periférica nas glândulas salivares (ZANZINGER; CZACHUSRSKI; SELLER, 1994). Em nossos experimentos encontramos alguns resultados relacionando o estágio de limiar anaeróbico (PAT ou AT) e atividade da amilase no último estágio de exercício, com a concentração de NO salivar dos estágios correspondente.

Em nosso trabalho observamos um aumento da concentração de NO salivar durante teste crescente em cicloergômetro (Fig. 16, 17, 18, 19, 20, 21), evidenciando-se mudanças chave em sua concentração. Na literatura, durante exercício exaustivo, mostrou-se um aumento na atividade NOS endotelial e neuronal de ratos (ROBERTS et al., 1999), a qual esta refletida também em humanos, pois a concentração de NO aumenta tanto no sangue quanto na saliva durante exercício intenso (PANOSSIAN et al., 1999).

Nesse trabalho sugerimos que há dois padrões de resposta da variação da concentração de NO. A hipótese para o padrão "1" (Fig. 17 e 19), é que o NO esteja associado com a inibição da respiração celular, fazendo com que haja um aumento da concentração de lactato (pós-limiar) por débito de O₂ (ROWELL e SHEPHERD, 1996; McARDLE et al., 1996.), pois a atividade da NOS pode inibir a respiração mitocondrial no músculo esquelético (KING et al., 1994; KOBZIK et al., 1995) e o NO pode influenciar na homeostasia do cálcio (STAMLER e MEISSNER, 2001).

Em relação à hipótese para o padrão "2" (Fig. 16e 18), mostrou-se em cavalos, que inibindo-se não especificamente as isoformas de NOS durante o

exercício, há um aumento da concentração de lactato plasmático (MILLS et al., 1999). Além disso, a inibição da NOS não mostrou afetar a captação de oxigênio durante o exercício em humanos (BRADLEY et al., 1999). Assim dados da literatura em relação ao NO e lactato não estão em concordância.

A primeira característica chave na análise dos resultados é o aumento (7 voluntários) ou queda (4 voluntários) acentuados, da concentração de NO (Tab. 15), no estágio de limiar anaeróbico (PAT e/ou AT). Sabe-se que o limiar anaeróbico está correlacionado com o limiar de catecolaminas plasmáticas, (GREEN et al., 1983; MAZZEO e MARSHALL, 1989). Sabe-se que o NO modula a calibração dos vasos pelo aumento da sua concentração endotelial, sendo que sua liberação se dá ou pela força de cisalhamento (SEGAL, 1994) ou pela liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (KINGWELL, 2000), que inibe o sistema adrenérgico (VANHOUTTE et al., 1981; VANHOUTTE e MILLER, 1989). A segunda característica importante para esta análise no último estágio de exercício, foi enquanto a concentração de NO, em relação ao estágio anterior, sofreu uma acentuada diminuição (Tab. 15), a atividade da amilase salivar alcançou seu pico máximo (Tab. 16). Em relação a isso, foi afirmado que uma alta concentração de α -amilase é considerada o melhor indicador da secreção salivar evocada pela atividade adrenérgica (ANDERSON et al., 1984). Além disso, a vasoconstricção seria necessária para haver um aumento na perfusão (NEWMAN et al., 1996). Sugerimos assim que este possível aumento da concentração de catecolaminas durante o exercício pode se dar pela possível necessidade de uma maior vasoconstricção após o estágio de limiar anaeróbico e também que no final do exercício o organismo tenha uma nova necessidade em realizar vasoconstricção e para isso promova um possível novo aumento acentuado na concentração de catecolaminas.

A terceira característica refere-se aos dados obtidos no final do exercício. Trinta minutos após o exercício, nove dos onze indivíduos tiveram suas concentrações de NO acima da basal ($p < 0,05$) (Tab. 15), enquanto que a atividade da amilase teve queda em relação ao último estágio ($p < 0,05$) (Tab. 16). Tendo em vista o embasamento da segunda característica, sugerimos

que há uma possível regulação recíproca entre NO e sistema adrenérgico, pois na maior parte do exercício a amilase e o NO se contrapõem.

No último estágio, houve dificuldade com a obtenção da saliva pelos voluntários (em três deles não houve saliva suficiente para dosagem de NO), e observou-se um acentuado aumento da viscosidade. Sabe-se que a estimulação simpática (via noraepinefrina) leva a alta secreção de proteínas enquanto que a parassimpática (via acetilcolina) leva a produção de fluidos, este é derivado da rede vascular (SCHNEYER, 1976; DENNISS. e YOUNG, 1978; BAUM, 1993). É importante considerar também que, a viscosidade sanguínea aumenta durante o exercício intenso (CAILLAUD et al., 2002). Estes fatos, junto com aqueles mencionados na segunda característica, servem de base para propormos uma possível relação entre viscosidade sanguínea e salivar e que o NO seja um biomarcador da exaustão física e um dos responsáveis por ela.

Assim nossos resultados sugerem que o possível aumento da concentração de catecolaminas durante o exercício pode se dar pela necessidade de haver uma maior vasoconstricção e que pode haver uma possível regulação recíproca entre NO e sistema adrenérgico e que NO seja um biomarcador da exaustão física e um dos responsáveis por ela. Contudo, sugerimos que o NO desempenhe um papel muito importante na capacidade aeróbica máxima do indivíduo, podendo ser um biomarcador da exaustão física e um dos responsáveis por ela. Esses dados precisam ser repetidos, pois o "n" pode não ser adequado.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Uberlândia (FAEFI e INGEB) pelo apoio na realização das análises e nos testes (Em especial ao Laboratório de Fisiologia da Educação Física-UFU). A CAPES pelo apoio de bolsa de mestrado. A Romeu P. M. S., Luciana D. R., Cibele L. A., Aníbal M.M. N., pelo apoio na coleta e análise das amostras e Ismair T. R., pelo suporte computacional, à Márcia R.S.B. e Luiz C.V.S.Jr pelo apoio com a escrita do artigo.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAHAM, R.Z.; KOBZIG, L.; MOODY, M.R.; REID, M.B.; STAMLER, J.S. Cyclic GMP is a second messenger by which nitric oxide inhibits diaphragm contraction. **Comp Biochem Physiol A Physiol**. v.119, p.177-183, 1998.
2. ANDERSON, L. C.; GARRETT, J. R.; JOHNSON, D. A.; KAUFFMAN, D. L.; KELLER, P.J.; THULIN, A. Influence of circulating catecholamines on protein secretion into rat parotid saliva during parasympathetic stimulation. **J. Physiol**. v.352, p.163-171, 1984.
3. BALON, T.; NADLER, J. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. **J. Appl. Physiol**. v.77, p.2519-2521, 1994.
4. BAUM, B.J. Principle of saliva secretion. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.17-23. Sept.1993. Número especial.
5. BODIS, S.; HAREGEWOIN, A. Evidence for the release and possible neuronal regulation of nitric oxide in human saliva. **Biochemical and biophysical research commol/Lunications**. Massachusetts, v.194, n.1, p.347-350, Jul, 1993.
6. BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Biding. **Protein Assay By Dye Biding**. p.248-54, Jan, 1976.
7. BRADLEY, S.; KINGWELL, B.; McCONNELL, G. Nitric oxide sintetase inhibition reduce leg glucose uptake, but not blood flow during dinamic exercise in humans, **Diabetes**, v.48, p.1815-1821, 1999.
8. CAILLAUD, C.; CONNES, P.; BOUIX, D.; MERCIER, J.; Does haemorheology explain the paradox of hypoxemia during exercise in elite athletes or thoroughbred horses? **Clin Hemorheol Microcirc**, v.26, nº3, p.175-81, 2002.- Resumo disponível na base de dados MedLine, 1966-2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em Jan, 2003.
9. CALVO, F.; CHICHARRO, J.L.; BANDRÉS, F.; LUCÍA, A. PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L.L.; VAQUERO, A .F.; LEGIDO, J.C. (). Anaerobic threshold determinatin with analysis of salivary amilasy. **Can. J. Appl. Physis**. v.22, nº6, p.553-561, 1997.
10. CHATTERTON, R.T. Jr; VOGELSONG, K.M.; LU, Y.C.; ELLMAN, A.B.; HUDGENS, G.A. Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. **Clin Physiol**. v.16, nº4, p.433-48, Jul, 1996.
11. CHICHARRO, J.L.; LUCIA, A.; PEREZ, M.; VAQUERO, A.F.; URENA, R. Saliva composition and exercise. **Sports Med**. v.26, nº1, p.17-27, Jul, 1998.
12. CHICHARRO, J.L.; LEGIDO, J.C.; ALVARES, J.; SERRATOSA, L.; BANDRES, F.; GAMELLA, C. Saliva electrolytes as a useful tool for anaerobic threshold determination. **Kur- J.Appl Phys**. Madrid, v.68, p.214-218, Dec, 1994.

13. CLARK, M.G.; RATTIGAN, S.; DORA, K.A.; NEWMAN, J.M.B.; VINCENT, M.A. Biochemistry of exercise. *Human Kinetics*, Sydney. p.35-46, 1998.
14. DAWES, C. Consideration in the development of diagnostic tests on saliva. *Annals of the New York Academy of Science*, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.265-269, Sept, 1993. Número especial.
15. DENNISS, A.R.; YOUN, J.A. Modufication of salivary duct eletrolyte transport in rat and rabbit by physalaemin. VIP, GIP, and other enterohormones. *Pflügers Arch.* v.376, p.73-80, 1978.
16. GRANGER, D.L.; TAINTOR, R.R.; BOOCKVAR, K.S.; HIBBS Jr, J.B. Determination of Nitrate and Nitrit in Biological Samples Usin Bacterial Nitrate Reductase coupled with the Griess reaction. *Methods: A Comp. Meth. Enz.* Califórnia, v.7, p.78-83, Feb, 1995.
17. GREEN, H.J.; HUGSON, R.L.; ORR, G.W.; RANNEY, D.A. Anaerobic threshold, blood lactate and muscle metabolites in prograssive exercise. *J Appl Physiol.* v.54, 10032-10038, 1983.
18. GUILBAULT, G. G.; PALLESCHI, G. Non-invasive biosensors in clinical analysis. *Biosensors & Bioelectronic*, nº10, p.379-392. 1995.
19. KING, C.E.; MELINYSHYN, M.J.; MEWBURN, J.D.; CURTIS, S.E.; WINN, M.J.; CAIN, S.M.; CHAPLER, C.K. Canine hindlimb blood flow and O2 uptake after inhibition of EDRF/NO synthesis. *J Appl Physiol.* v.76, p.1166-1171, 1994.
20. KINGWELL, B.A. Nitric Oxid-mediated metabolic regulation during exercise: effects of trainig in heath and cardiovascular disease. *The FASEB J.* Melbourne, v.14, p.1685-96, Sept, 2000.
21. KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDT, D.S.; KOBZIK, L.; REID, M.B.; BREDT, D.S.; STAMLER, J.S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature.* v.372, p.546-548, 1994.
22. KOBZIK, L.; STRINGER, B.; BALLIGAND, J.L.; REID, M.B.; STAMLER, J.S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commol/Lun.* v.211, p.375-381, 1995.
23. LAU, K.S.; GRANGE, R.W.; CHANG, W.J.; KAMMOL/L, K.E.; SARELIUS, I.; STULL, J.T. Skeletal muscle contractions stimulate cGMP formation and attenuate vascular smooth muscle myosin phosphorylation via nitric oxide. *FEBS Lett.* v.431, p.71-74, 1998.
24. LEHMANN, M.; SCHIMID, P.; KEUL, J. Plasam catecholamines and blood lacteate accumulation during incremental exhaustive exercise. *Int. Jornal of Sports Med.* v.6, p.78-81, 1985.
25. LOHINAI, Z.; BURGHARDT, B.; ZELLES, T.; VARGAS, G. Nitric Oxide modulate salivary amylase and fluid, but not eppidermal growth factor secretion in conscisius rat. *Life sciences*, v.64, n.11, p.953-963. 1999.
26. MARLETTA, M.A. Mammol/Lalian synthesis of nitrite and N-nitrosalting agents. *Chem. Res. Toxicol*, v.1, p.249-257, 1988.

27. MAZZEO, R.S.; MARSHALL, P.M. Influence of plasma catecholamines on the lactate threshold during graded exercise. *J. Appl. Physiol.* v.67, p.1319-1322, 1989.
28. MILLS, P.C.; MARLIN, D.J.; SCOTT, C.M.; SMITH, N.C. Metabolic effects of nitric oxide synthase inhibition during exercise in the horse. *Res Vet Sci.* v.66, n°2, p.135-8, Apr, 1999.
29. NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. *Annals of the New York Academy of Science*, Saliva as a diagnostic fluid. New York, v.694, p.72-77. Sept, 1993. Número especial.
30. NEWMAN, J.M.B, DORA, K.A, RATTIGAN, S., EDWARDS, S.J., COLQUHOUN, E.Q., e CLARK, M.G. Norepinephrine and serotonin vasoconstriction in rat hindlimb control different vascular flow routes. *American Journal of Physiology.* v.70, p.E689-E699, 1996.
31. PANOSSIAN, A.G.; OGANESSIAN, A.S.; AMBARTSUMIAN, M.; GABRIELIAN, E.S.; WAGNER, H.; WIKMAN, G. Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva. *Phytomedicine.* v.6, n°1, p.17-26, Mar, 1999.
32. PARK, Y.C.; JUN, C.D.; KANG, H.S.; KIM, H.M.; CHUNG, H.T. Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology.* v.87, n.2, p.296-302, 1996.
33. PERKINS, W.J.; HAN, Y.S.; SIECK, G.C. Skeletal muscle force and actomyosin ATPase activity reduced by nitric oxide donor. *J Am Physiol Soc.* p.1326, 1997.
34. RANTONEN, P.J.; MEURMAN, J.H. Correlations between total protein, lysozyme, immunoglobulins, amylase, and albumin in stimulated whole saliva during daytime. *Acta Odontol Scand.* Oslo, v.58, n°4, p.160-5, Aug, 2000.
35. RETTORI, V., LOMNICZI, A., ELVERDIN, J.C., SUBURO, A., FALETTI, A., FRANCHI, A., MCCANN, S.M. Control of salivary secretion by nitric oxide and its role in neuroimmunomodulation. *Ann N Y Acad Sci.* v.917, p.258-67- 2000. Resumo disponível na base de dados MedLine, 1966-2003. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em Jan, 2003.
36. ROBERTS, C.K.; BARNARD, R.J.; JASMAN, A.; BALON, T.W. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* v.277, p.E390-E394, 1999.
37. SCHNEYER, L.H. Sympathetic control of Na, K transport in perfused submaxillary main duct of rat. *Am J. Physiol.* v.230, p341-345, 1977.
38. SCHNEYER, L.H., YOUNG, J.A., SCHNEYER, C.A. Salivary secretion of electrolytes. *Physiol Rev* v.52, p.720-777, 1972.
39. SEGAL, S. Cell-to-cell communication coordinates blood flow control. *Hypertension.* v.23, p.1113-1120, 1994

40. STAMLER, J. Nitric oxide in the cardiovascular system. **Review in depth.** In: Nitric Oxide in the Cardiovascular System. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, p. 273, 1999.
41. STAMLER, J.S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiology Reviews**, North Carolina, v.81, n°1, p.209-237, Jan.2001.
42. TAYLOR, C.A.; CHENG, C.P.; ESPINOSA, L.A.; TANG, B.T.; PARKER, D.; HERFKENS, R.J. In vivo quantification of blood flow and wall shear stress in the human abdominal aorta during lower limb exercise. **Ann Biomed Eng.** v.30, n°3, p.402-8, Mar, 2002.
43. VANHOUTTE, P.; MILLER, V. Alpha2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. **Am. J. Med.** v.87, p.1S-4S, 1989.
44. VANHOUTTE, P.; VERBEUREN, T.; WEBB, R. Local modulation of adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. **Physiol. Rev.** v.61, p.151-247, 1981.
45. VILLIGER, B.; EGGER, K.; LERCH, R.; PROBST, H.; SCHNEIDER, W.; SPRING, H.; TRITSCHLER, T. **Resistência.** Livraria Santos ed.ltda. 1ª ed. 1995.
46. WALSH, N.P.; BLANNIN, A.K.; CLARK, A.M.; COOK, L.; ROBSON, P.J.; GLEESON, M. The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and alpha-amylase. **J Sports Sci.** v.17, n°2, p.129-134, Feb, 1999.
47. WASSERMAN, K. The anaerobic threshold measurements to evaluate exercise performance. **America Review Respiration Disease.** v.129, p.35-40, 1984.
48. WASSERMAN, K.; HANSEN, J.E.; SUE, D.Y.; WHIPP, B.J. Principles of exercise testing and interpretation. **Lea & Febiger**, Philadelphia, 1986.
49. WASSERMAN, K.; McLLORY, M.B. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **American Journal Cardiology.** v.14, p.844-852, 1964.
50. YOUNG, J.A.; VAN LENNEP, E.W. Secretion of salivary and salt gland. In: GIEBISCH, G., TOSTESON, D.C; USSING, H.H. Editors **Membrane transport in biology**, Berlin; **Springer-Verlag**, p.563-74, 1979.
51. ZANZINGER, J.; CZACHURSKI, H.; SELLER, H. Inhibition of sympathetic vasoconstriction is a major principle of vasodilation by nitric oxide in vivo. **Circ Res.** v.75, p.1073-1077, 1994.

4 ANEXOS

4.1 ANEXO- I - ANÁLISE DE PROTEÍNA

(BRADFORD, 1976)

PREPARAÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD:

1. 100 mg de Comassie Blue G;
2. 50 mL de Etanol 95%;
3. 100 mL de Ácido Orto-fosfórico;
4. Completar para 1000 mL com H₂O desionizada.

Obs.: Verificar a calibração do dispensador.
Calibração: Dispensar 5 vezes o volume de 3mL em uma proveta graduada e analisar.

ANÁLISE DE PROTEÍNA:

Substâncias:

1. BSA desionizada (Soro Albumina Bovina);
2. H₂O (de acordo com a curva);
3. Reagente de Bradford;
4. Amostra alvo.

Material:

1. caixa de isopor com gelo;
2. tubos de 6mL (de acordo com o nº de amostras)
3. pipetas de 10 µL e 100 µL;
4. suporte para tubos;
5. dispensador;
6. pisseta com água;
7. cubeta;
8. papel higiênico;
9. Espectrofotômetro (ligar 15min antes);
10. Cubeta;
11. Papel Higiênico;

Obs.: a quantidade de tubos de 6mL dependerá do número de amostras de saliva, deve-se considerar o número em duplicata.

Procedimentos

1. Ligar o espectrofotômetro 15 minutos antes do início da análise;
2. Identificar os tubos de 6 mL;
3. Descongelar a saliva em temperatura ambiente;
4. Preparar a curva padrão de BSA em duplicata (ver tabela abaixo); obs: não adicionar o reagente ainda;
5. Colocar 30 µL de saliva nos tubos correspondentes;
6. Preparo da curva padrão para dosagem de saliva;
 - 6.1. coloque a água nos tubos previamente identificados;
 - 6.2. coloque o BSA nos tubos correspondentes.
7. Colocar 30 µL de saliva, em duplicata, nos tubos correspondentes.

Tabela - 22

PREPARAÇÃO DA CURVA PADRÃO DE BRADFORD					
Pontos da curva	H ₂ O (μL)	BSA-1mg/mL (μL)	Reagente de Bradford (mL)	10'	Ler À 595nm
P1	90	10	3	M	
P2	80	20	3	I	
P3	70	30	3	N	
P4	60	40	3	U	
P5	50	50	3	T	
P6	40	60	3	O	S

8. Colocar o reagente de *Bradford*, começando pelo controle; P1, P2, P3, P4, P5, P6, sucessivamente nas amostras; e suas duplicatas com um intervalo de 50 segundos entre cada tubo.

Tabela - 23

TABELA DE TEMPO DA COLOCAÇÃO DO REAGENTE DE BRADFORD									
B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	A1	A2	A3
	P1D	P2D	P3D	P4D	P5D	P6D	A1D	A2D	A3D
0	00'	1'40"	3'20"	5'00"	6'40"	8'20"	10'00"	11'40"	13'20"
	50"	2'30"	4'10"	5'50"	7'30"	9'10"	10'50"	12'30"	14'10"

9. Ler no espectrofotômetro a 595nm de 9'-11'(maior atividade do reagente). Porém, ao ler a primeira, as outras terão de ser lidas com o mesmo intervalo de tempo da colocação das amostras (50" segundos).

Tabela - 24

TABELA DE TEMPO DA LEITURA DA AMOSTRA									
B	P1	P2	P3	P4	P5	P6	A1	A2	A3
	P1D	P2D	P3D	P4D	P5D	P6D	A1D	A2D	A3D
-	10'20"	12'00"	13'40"	15'20"	17'00"	18'40"	20'20"	22'00"	23'40"
	11'10"	12'50"	14'30"	16'10"	17'50"	19'30"	21'10"	22'50"	24'30"

4.2 ANEXO- II - ANÁLISE DO ÓXIDO NÍTRICO NA SALIVA

ANÁLISE PARA ATÉ 39 AMOSTRAS EM DUPLICATA

Material:

1. tubo de 6 mL;
2. 1 placa de ELISA;
3. pipeta de 100 μ L;
4. suporte para tubos de 6 mL;
5. caixa de isopor com gelo;
6. espectrofotômetro (deve ser ligado 15 minutos antes);
7. ponteiras para pipeta;
8. descarte para ponteiras da pipeta;
9. agulha descartável.

Substâncias:

1. 15 mL de água destilada ou desionizada;
2. n-naftil-etileno-dihidroxicloreto (NEED) a 0,1%;
3. 100 μ L (0,10 mL) de saliva;
4. ácido fosfórico a 2,5%;
5. sulfanilamida a 1%;
6. 0,069 g nitrito de sódio (NaNO_2);
7. 10 mL água destilada ou desionizada.

Preparação de solução-estoque:

1. Materiais:
 - a. 2 provetas de 25 ou 50 ml;
 - b. balança;
 - c. espátula;
 - d. 2 vidros vazios.
 - e. 2 Pratinhos de plástico.
2. Substâncias:
 - a. Sulfanilamida P.M. 172,21(Sigma) $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$
 - b. N-(1-Naphthyl) ethyl-ene Diamine. (NEED) P.M.= 259,2 (Sigma)
 - c. Ácido Fosfórico a 2,5%.
3. Procedimento de calculo:

A- Para preparar 20ml de ac. Fosfórico a 2,5% com Sulfidrilamina a 1%

1g (Sulfidrilamina) -	100mL
X	- 20mL
X= 0,2g	

B- Para preparar 20ml de ácido fosfórico a 2,5% com NEED 0,1%

$$\begin{array}{rcl} 0,1\text{g (NEED)} & - & 100\text{ml} \\ \text{Xg} & - & 20\text{ml} - \text{X}=0,02\text{g} \end{array}$$

C- Para preparar 1mL NaNO₂ a 1M (solução estoque)

$$M(\text{g}) = PM (\text{massa atômica}) \cdot V(\text{Litro}) \cdot M(\text{molaridade})$$

$$M = 69 \cdot 0,001\text{L} \cdot 1\text{M}$$

$$M = 0,069 \text{ gramas (1ml de água desionizada)}$$

Procedimentos:

- 1) Ligar o espectrofotômetro 15 minutos antes do início da análise;
- 2) Descongelar a saliva em temperatura ambiente;
- 3) Preparar curva padrão (P1=400 μM) de nitrito a partir da solução estoque: NaNO₂ a 1 M (1.000 mmol/L);:

a) Diluição de 1M para 10 mmol/L

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \text{ mmol/L} \times 600 \mu\text{L} = 1000 \text{ mmol/L} \times V_2 - V_2 = 6 \mu\text{L}$$

$$6 \mu\text{L de NaNO}_2 + 594 \mu\text{L de água desionizada mmol/L}$$

b) Diluição de 10mmol/L para 400 μM

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0,4 \text{ mmol/L} \times 1.000 \mu\text{L} = 10 \text{ mmol/L} \times V_2$$

$$V_2 = 40 \mu\text{L}$$

$$40 \mu\text{L de NaNO}_2 + 960 \mu\text{L de água desionizada (10 mmol/L)}$$

4) Preparação da Placa de ELISA com as amostras

Figura - 22

FIGURA ESQUEMÁTICA DE UMA PLACA DE ELISA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Obs.: identifique todos os poços utilizados na tampa da placa de ELISA.

- a) Colocar 50 μ L da solução NaNO_2 a 400 μ M (0,4 mmol/L) nos poços 1A e 1B da placa de ELISA
- b) Colocar 100 μ L da solução NaNO_2 a 400 μ M (0,4 mmol/L) nos poços 2A e 2B da placa de ELISA;
- c) Colocar 50 μ L de água desionizada nos poços 3A a 8A e 3B a 8B da placa de ELISA;
- d) Fazer diluição de ordem 2 a partir dos poços 2A e 2B até 8A e 8B, ao final descartar 50 μ L dos poços 8A e 8B.
- e) Colocar 50 μ L de água desionizada nos poços 9A e 9B (Branco);
- 5) Colocar 50 μ L de saliva até 39 amostras em duplicata, nos restantes dos poços (exceção 1A a 9A e 1B a 9B);
- 6) Preparar o reagente de GRIESS:
 - a) Colocar em tubo de 6 mL 50% do volume final do reagente de GRIESS de sulfanilamida a uma concentração de 1% e 50% do volume final do reagente de GRIESS de NEED a concentração de 0,1%.
 - b) **Obs.:** de acordo com o número de amostras calcular a quantidade deste reagente, preparando sempre aproximadamente 400-1000 μ L a mais;
- 7) Colocar 50% do reagente de GRIESS em todos os poços começando pelos 9A e 9B (controle), 1A, 1B, 2A, 2B, assim sucessivamente até 8A e 8B (curva). Nos poços em que houver saliva, começar sempre da original para duplicata correspondente.
- 8) Leia a placa de ELISA imediatamente no espectrofotômetro a 570nm duas vezes consecutivas.

Obs.: dê leves toques na placa para que os reagentes se misturem até que toda solução fique no fundo do poço. Caso haja bolhas retire-as com uma agulha descartável.

Digite os dados da leitura mais confiável para o Software "Microplate".

4.3 ANEXO- III - COLETA E ANÁLISE SANGUÍNEA

Material Utilizado:

- 1) Capilares eparinizados.
- 2) Lanceta (02).
- 3) Luvas cirúrgicas.
- 4) Álcool
- 5) Algodão
- 6) Lactímetro
- 7) Eppendorfes de 1,5mL.
- 8) Eparina.
- 9) Solução de Fluoreto de Sódio a 1%.
- 10) Óculos protetor.
- 11) Caixa com Gelo.

Procedimento prévios:

Calibrar os capilares.

Identificar os eppendorfs; colocar 50 μ L de fluoreto de sódio a 1%; e colocá-los no gelo.

Realizar a assepsia do local com álcool.

Furar o lobo da orelha com lanceta descartável.

Procedimento de coleta

Estimular o lobo da orelha.

Secar bem a pele antes de começar a coletar, para evitar contaminação com suor.

Coletar 25 μ L de sangue e colocar no eppendorf.

Congelar (-20°C) e realizar a análise.

4.4 ANEXO- IV - ANÁLISE DA AMILASE SALIVAR POR CLORONITROFENOL

Material Utilizado:

1. tubos de 6mL (de acordo com o nº de amostras)
2. pipeta de 1000µL e 10µL;
3. banho-maria a 37°C;
4. 1 suporte para tubos de 6mL;
5. 1 suporte para eppendorfs (de borracha sem fundos);
6. 1 caixa de isopor com gelo;
7. 1 vibrador para tubo 6mL e eppendorf (Vortex);
8. espectrofotômetro a 405nm (ligar 15 minutos antes);
9. 1 descarte para ponteiros da pipeta;
- 10.2 Cubetas.
11. Papel Higiênico.
12. Pisseta com água destilada ou desionizada.

Fórmula de cálculo:

Atividade da amilase = $(A_{t_{90}} - A_{t_{30}}) \times 3953$
(U/dL)

At = Absorbância do teste.

$\mu\text{kat} = 0,01667 \times \text{U/DI}$

Definição de Unidade: uma Unidade internacional é igual à quantidade de enzima gerando 1 µmol de produto por minuto.

Obs.: Todas substâncias, de acordo com a instrução de uso do kit Analisa Cat.225- Amilase por cloronitrofenol, foram reduzidas em 50%.

Substâncias:

- a. 10mL de água destilada ou desionizada;
- b. substrato (de acordo com o nº de amostras);
- c. 10µL de saliva por amostra;
- d. Kit da empresa Analisa para amilase salivar por cloronitrofenol, Cat. 225.

Procedimentos:

Ligar o espectrofotômetro 405nm e banho-maria 15 minutos antes do início da análise.

Descongelar a saliva em temperatura ambiente e mantê-la no gelo;

Diluir a saliva de 200 vezes em água destilada ou desionizada colocando no agitador por 10 segundos.

Colocar 0,5mL do substrato em tubos de 6mL e deixar em banho-maria a 37°C por mais de 1 minuto.

Colocar 10µL de saliva acionando simultaneamente o cronômetro.

Agitar a amostra por 5 segundos.

Ler a amostra em 30 e 90 segundos em um comprimento de onda 405.

Obs.: Após a leitura da absorbância dos testes e duplicatas, deve-se fazer a média e calcular a atividade da amilase na saliva de acordo com a seguinte fórmula do kit Cat. 225 da analisa.

4.5 ANEXO- V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)

Eu _____, RG _____
 nascido em ___/___/___ e domiciliado à _____
 município de _____, usuário (ou responsável legal pelo usuário
 _____), declaro que consinto em participar como

voluntário do Projeto de pesquisa. "BIOMARCADORES SALIVARES DO EXERCÍCIO FÍSICO PARA DETERMINAÇÃO DO LIMAR ANAERÓBICO HUMANO" sob coordenação do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, com responsabilidade médica Rimmel Amador Guzman Heredia e análise bioquímica Miguel Armando Bortolini Junior. Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido que: a) o estudo será realizado com amostras de saliva (Método de cuspe) e sangue (lobo da orelha, 25µL) para pesquisa de biomarcadores na saliva; b) posso consultar o pesquisador em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone (0XX) 34 3218-2477, para esclarecimento de quaisquer dúvidas; c) estou livre para a qualquer momento deixar de participar da pesquisa sem apresentar justificativa e sem prejuízo a minha pessoa; d) todas as informações por mim fornecidas e os resultados individuais obtidos serão mantidos em sigilo e que os resultados coletivos serão divulgados em reuniões e revistas científicas; e) Este estudo será importante na investigação de biomarcadores salivares correlacionados aos plasmáticos; f) Estou plenamente informado do projeto, conforme a Carta de Esclarecimento, previamente lida por mim e discutida com o responsável.

Assim, consinto em participar do Projeto de Pesquisa em questão.

_____, _____ de _____ de _____.

 Usuário/Responsável legal

 Prof. Dr. Foued Salmen Espindola
 Coordenador

Obs: Este termo apresenta-se em duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante legal e a outra ao Pesquisador.

Professor: Miguel Armando Bortolini Junior
 Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica
 Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular.
 Endereço: Rua Acre - Bloco 2E39A - Campus Umuarama
 CEP- 38400-982-Uberlândia- MG.

4.6 ANEXO- VI - OPERAÇÃO DO FOTÔMETRO

I - LIGAR

- 1- Ligar o compressor – pressão=18 kgf/cm (deixar a agulha livre – sem água);
- 2- Ligar o aparelho Fc 130;
- 3- Abrir válvula de gás do botijão;
- 4- Abrir válvula de gás do aparelho Fc 130;
- 5- Apertar ignição até acender a chama;
- 6- Regular entrada de gás na chaminé até conseguir chama azul, em pirâmides de altura um pouco superior ao "patamar" de referência.

II – CALIBRAR

1. Material utilizado:
 - a. 3 Becker de 50-80mL
 - b. Pipeta de 1000 μ L e 100 μ L.
 - c. 1 Recipiente de 10mL.
2. Substâncias Utilizadas:
 - a. 200mL de água destilada/desionizada (dependendo de qual foi utilizada para diluir a amostra.)
 - b. Substância padrão (dependendo da quantidade a ser feita para calibração)
3. Estabilizar 15 minutos, no ajuste do "ZERO", com água destilada/desionizada (Dependendo qual da água utilizada para diluiu a amostra; não deixar faltar água).
Obs.: Cuidado: não encostar na agulha (sensível, quebra fácil).
4. Diluir o padrão com água destilada/desionizada, 100X.
5. Calibração do Sódio (Na)
 - a. Posicione o filtro na posição Na⁺;
 - b. Aspire a água (destilada/desionizada) e ajuste o zero até que a agulha do visor fique bem estável;
 - c. Aspire a solução padrão e ajuste no valor 72 (utilizar botão "sensibilidade" fina - grossa) até que a agulha do visor fique bem estável;
 - d. Ajuste novamente o zero com água (destilada/desionizada).
 - e. Repetir 3 vezes o processo até estabilizarem os valores zero e 72.
 - f. Dado que a concentração do padrão, para Na⁺, é de 144mEq e a calibração está em 72, multiplicar-se-a a leitura das amostras por 2, se a diluição for à mesma.

Obs.: No caso do volume da amostra ser reduzido (<10mL), coloque-a em eppendorf e com ajuda de uma 2ª pessoa, pipetando a solução no eppendorf, também siga os passos acima.

6. Calibração do potássio (K^+);

- a) Posicione o filtro na posição k;
- b) Aspire a água (destilada/desionizada) e ajuste o zero até que a agulha do visor fique bem estável;
- c) Aspire a solução padrão e ajuste no valor 50 (utilizar botão "sensibilidade" fina - grossa) até que a agulha do visor fique bem estável;
- d) Ajuste novamente o zero com água (destilada/ desionizada).
- e) Repetir 3 vezes o processo ate estabilizarem os valores zero e 50.
- f) Dado que a concentração do padrão, para K^+ , é de 5mEq e a calibração está em 50, dividir-se-á a leitura das amostras por 10, se a diluição for à mesma.

III - DESLIGAR

- 1-Fechar válvula de gás do aparelho Fc 130;
- 2-Fechar válvula de gás do botijão;
- 3-Desligar chave liga – desliga do aparelho Fc 130;
- 4-Desligar compressor;
- 5-Desligar pinos de tomada da rede:
 - Aparelho Fc 130 (220v)
 - Compressor (110v).

Obs.: No caso do volume da amostra ser reduzido (<10mL), coloque-a em eppendorf e com ajuda de uma 2ª pessoa, pipetando a solução no eppendorf, siga os passos acima.

ATENÇÃO: Durante o uso NÃO encoste nem olhe por cima da chaminé. Você pode se queimar, olhe a chama pela janela apropriada.

IV – Análise de Na^+ e K^+ na saliva, por Fotometria de Chama.

1. Material utilizado:
 - a. Tubos eppendorfs (de acordo com o número de amostra).
 - b. 1 Pipeta 1000 μ L.
 - c. Recipientes de 10mL(de acordo com o número de amostra).
 - d. 1 becker de 200-1000mL
2. Substâncias Utilizadas
 - a) Amostra de saliva diluída 100X para Na^+ e 200X K^+ .
 - b) Padrão diluído 100X (de acordo com o nº de amostras)
 - c) Água destilada/desionizada
3. Após seguir o Protocolo de operação do Fotômetro de Chama, poderá fazer a análise de Na^+ e K^+ na saliva.
4. Para as análises de Na^+ e K^+ .
 - a. Diluir 80 μ L de saliva em 7.920mL de água (destilada/desionizada).

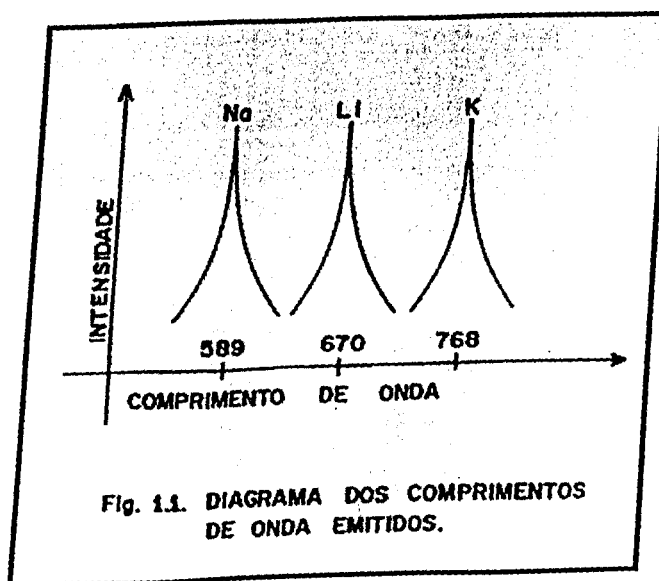
- b. Pegar 2,5mL desta saliva diluída 100 vezes (Da análise de Na^+) e acrescentar 2,5mL da mesma água (Para análise de K^+).
5. Quando estiver com o Fotômetro equilibrado para Na^+ .
- Pegue os 5mL da saliva diluída 100 vezes e coloque 1,5mL em um eppendorf.
 - Coloque-o na agulha do Fotômetro e comece a aspiração.
- Obs.: Com a pipeta mantenha sempre o volume do eppendorf suficiente para aspiração do líquido.
- Anote o resultado quando a agulha do visor estiver estabilizada.
- Obs.: A cada 10 (ou menos) mensurações calibre o aparelho novamente.
6. Quando estiver com o Fotômetro equilibrado para K^+ .
- Proceda da mesma forma que o fez para o Na^+ , salvo que a saliva deve estar diluída 200 vezes.

Obs.: A cada 10 (ou menos) mensurações calibre o aparelho novamente.

V. Princípios da Fotometria de Chama

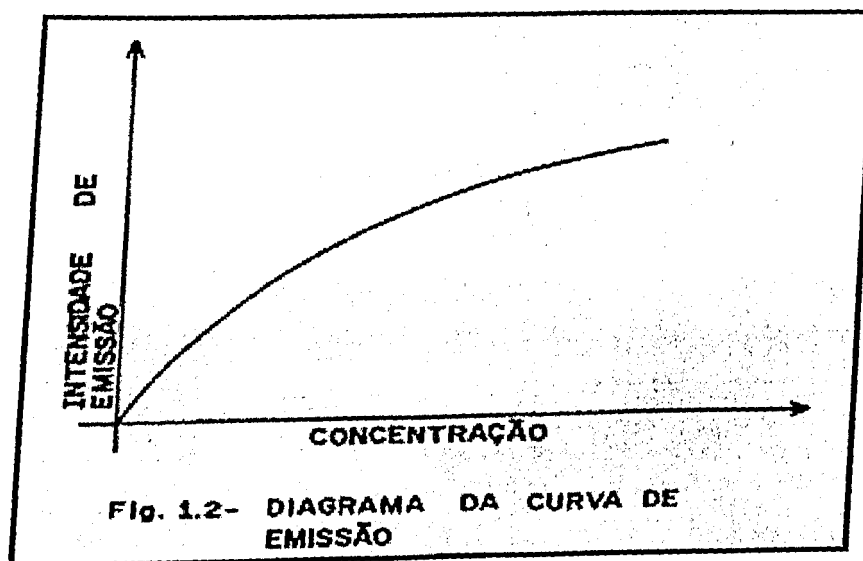
Os metais alcalinos, quando elevados a uma temperatura suficientemente alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos se esfriam, eles voltam ao estado normal não excitado e reemitem sua energia absorvida por radiação com comprimento de onda específicos, alguns dos quais na região visível da luz.

Figura - 23. DIAGRAMA DOS COMPRIMENTOS DE ONDA



Um metal alcalino aspirado por uma chama de baixa temperatura, na forma nebulizada vai, depois de excitado pela chama, emitir uma onda de frequência discreta que pode ser isolada por um filtro óptico. A emissão é proporcional (par baixas concentrações somente) ao número de átomos que estão voltando ao estado original que é por sua vez proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, à concentração da amostra.

Figura - 24. DIAGRAMA DA CURVA DE EMISSÃO



Um sinal elétrico proporcional à concentração do elemento na solução será obtido através de um fotodetector colocado atrás do filtro.

4.7 ANEXO- VII - PROTOCOLO DE COLETA DE FLUXO SALIVAR

Material Utilizado:

1. Caixa de isopor
2. Gelo
3. Proveta de 50mL
4. Chicletes
5. Guardanapo de papel
6. Eppendorfs, de 0,6 e 1,5mL, resfriados e já identificados (de acordo com o n.º de alíquotas).
7. Becker para descarte.
8. Suporte para eppendorfs.
9. Pipeta de 1000µL com ponteiras.
10. Descarte para ponteiras.
11. Mensurador de frequência cardíaca (Polar 610).
12. Cronômetro.

Procedimento de coleta do fluxo salivar

Após seguir as recomendações da tabela acima, principalmente "instruções prévias", e também preparar os materiais a serem utilizados siga os passos abaixo.

1. Identificar tubos de eppendorfs 1,5mL antes de começar a coleta
2. Colocar: FLT (Fluxo controle).
 - a. Três letras, para o ID do voluntário, sendo estas as primeiras do nome do voluntário (Ex.: Luiz Carlos V. S. Jr. = LCV) letra dos três 1º nomes. Caso a pessoa tenha, entre nomes e sobrenomes, menos de três, adicione a letra X.
 - b. Identificar tubos de eppendorfs 0,6mL antes de começar a coleta, para cada voluntário do item 2a fazer 7 destes, identificando-os no item 2a e acrescentando as siglas AMY (amilase), ALB (Albumina), NOX (Óxido Nítrico), ELE (Eletrólitos), PRO (Proteína Total), GEL (SDS-PAGE).
3. Pré pese a proveta e anote o resultado.
4. Certifique-se do correto andamento dos procedimentos.
5. Coloque a proveta dentro da caixa de isopor com gelo.
6. Deixe o guardanapo à mão do voluntário.
7. Coloque o Mensurador de frequência cardíaca no voluntário (Polar-S610) e inicie simultaneamente a coleta.
8. Logo antes de começar a marcar o tempo, peça ao voluntário que esvazie a boca, e a enxágue três vezes com água destilada ou desionizada.
9. Deve-se esclarecer ao voluntário a importância dele cuspir toda saliva na proveta, e não engolir nada e etc.

10. A frequência de mastigação deve ficar em +/- 1/min.
 11. Com o cronômetro à mão, dê o chiclete ao voluntário.

Tabela - 25

TABELA DE INSTRUÇÕES PRÉVIAS PARA COLETA DE SALIVA NO TESTE ERGOMÉTRICO				
Procedimento quanto ao material	Procedimento quanto ao local	Procedimentos quanto à pessoa		
Manter a saliva no gelo	A luminosidade e o som devem ser padronizados.	Instruções Prévias (0,5 -2 horas antes)	Logo Antes da Coleta	Durante a coleta
Centrifugação prévia.	*A umidade do ar deve estar adequada.	Higiene Bucal Hidratação - Ingerir 400mL de H ₂ O.	Enxaguar a boca com H ₂ O destilada ou desionizada	Deve-se descartar toda saliva durante 10' de coleta
Tubos resfriados.	O cheiro do ambiente deve ser sempre o mesmo.	Abster-se de: Cigarro Comida		Não deixar contaminar a saliva com suor
Congelar até a análise.	*A temperatura deve estar entre 21-25°C.	Bebida (café, Chá) Drogas (incluindo medicamentos simpatomiméticos)	Descartar a saliva dos primeiros 2'	Seguir as recomendações do teste de esteira.

Baseada em PANDAL, S., 1990 apud BODIS HAREGEWOIN, 1993; NAVAZESH, 1993; WILSON, 1993; CHATTERTO, 1996; SHIRTCLIFF, 2001; NEDERFORS e DAHLÖF, 1992; ERICSON e TWETMAN, 1995; MORRISON, et al., 2003.

12. Ao seu mando de voz, o voluntário deve colocar o chiclete na boca e mascar.
 Obs.: ele deve mastigá-lo sempre a uma mesma frequência e alterando os lados da boca.
13. Com um outro mando de voz, o voluntário deve descartar a saliva no Becker de descarte (durante 2 minutos num copo descartável e 3 minutos em uma proveta graduada).
14. Quando o tempo estipulado estiver terminando deve-se avisar ao voluntário para que cuspa e esvazie totalmente a boca nos últimos dez segundos finais.
15. Após isso, o voluntário estará liberado da coleta de fluxo salivar.
16. Pese a proveta com saliva, diminua o peso dela sem a saliva e anote.
17. Espere 5 minutos, deixe a saliva parada na proveta e anote o fluxo.

Para a análise da saliva

1. Centrifugue a saliva de acordo com o recomendado (10 minutos; 4°C à 14000g de acordo com os testes).
2. Retire o sobrenadante, aliquote-os em eppendorfs e congele-os (no freezer a -80 °C ou a -20 °C, de acordo com o tempo para futura análise).
3. Todas amostras deverão ser aliquotadas, quando o volume for suficiente, em sete partes.

Para o Projeto de exercício em esteira

- I. Amilase - 20µL;
- II. Proteína total - 80µL;
- III. Eletrólitos (Na⁺ e K⁺) - 80µL;
- IV. Óxido Nítrico-250µL;
- V. Albumina-250µL;
- VI. Gel comum - 50µL;
- VII. Gel para metaloprotease - 50µL.
- VIII. Imunoglobulinas – 100 µL.

4.8 ANEXO- VIII - PROTOCOLO DE ANÁLISE DO LACTATO

Tabela - 26

RECEITA PARA FAZER 2L DO TAMPÃO "YSI" PARA LACTÍMETRO		
SUBSTÂNCIA	FÓRMULA MOLECULAR	QUANTIDADE
EDTA (Etileno dinitrílo) Ácido tetracético dissódio sal hidratado	$C_{10}H_{14}O_8N_2Na_2 \cdot 2H_2O$	1,08g
Ácido Benzoico	C_6H_5COOH	1,65g
Sódio fosfato monobásico	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	3,2g
Sódio fosfato	NaH_2PO_4	7,72g
Cloreto de sódio	$NaCl$	6,152g
Cloreto de Potássio	KCl	0,662g
Triton X-100	$C_{14}H_{21}-O-(CH_2-CH_2-O)_n-H$	2,0mL

Solução Tampão "YSI":

Pesar os sais, colocá-los em Becker de 500mL e dissolvê-los (usar agitador magnético).

Após estar totalmente dissolvido, colocá-lo em um balão volumétrico acima de 2L, pipetar 2,0mL de Triton X-100, e completar o volume.

Agitar (usar agitador magnético) até estar bem homogêneo.

Solução Referência "YSI":

Pipetar 9,0mL de solução tampão de Lactato 30mmol/L em um balão volumétrico (1L) e completar com tampão "YSI" para 1L agitar bem (usar agitador magnético).

CALIBRAÇÃO DO LACTÍMETRO "YSI"

1. Colocar a solução tampão "YSI" no recipiente "BUFFER".
2. Colocar a solução referência "YSI" no recipiente "REFERENCE".

3. Lavar "PRIMER" a câmara de reação (mínimo de 3X) e aguardar a polarização da membrana de 6nA (Lavando a câmara de reação algumas vezes).
4. Para calibrar: entrar no modo "CAL" e quando solicitado, injetar 25 μ L de solução padrão de lactato 5mmol/L. Repetir para confirmação.

P.S.(1): A calibração deve ser feita a cada 10 amostras.

5. Está pronto para dosar as amostras.

P.S.(2): Testar a linearidade da membrana, periodicamente (antes do início das dosagens) com a solução de lactato (15 e 30mmol/L) YSI.

4.9 ANEXO- IX - CARTA DE ESCLARECIMENTO

Uberlândia (MG), 17 de julho de 2002

Prezado senhor,

gostaríamos de informá-lo que será realizada uma pesquisa que procurará estudar os biomarcadores salivares durante o exercício físico. O objetivo desse trabalho é o de efetuar um estudo do exercício físico, relacionando a influência das substâncias endógenas expressas na saliva com as do sangue e avaliando a qualidade e intensidade de atividades físicas programadas. O desenvolvimento do projeto dar-se-á em um teste agudo em cicloergômetro para avaliação física, coletando-se saliva e sangue. O período previsto de duração deste projeto é de 2 meses, sendo avaliados 2 voluntários por dia (de acordo com a disponibilidade do laboratório de fisiologia no campus Educação Física da Universidade Federal de Uberlândia), sob a responsabilidade geral do Prof Dr. Foued Salmen Espindola, de análise bioquímica do Prof. Miguel Armando Bortolini Junior e médica de Rimmel Amador Guzman Heredia. Vimos através desta pedir-lhe que participe desta pesquisa como voluntário, a sua participação é muito importante para que possamos investigar as relações das substâncias encontradas na saliva com a atividade física. Em caso de dúvida ou alguma orientação, entre em contato com o Prof Dr. Foued Salmen Espindola ou com o Prof. Miguel Armando Bortolini Junior (0xx34) 3218-2477 em Uberlândia/MG.

Antecipadamente agradecemos a sua atenção.

Atenciosamente,

Prof Dr. Foued Salmen Espindola

4.10 ANEXO- X- COLETA E ARMAZENAGEM DE SALIVA DURANTE O TESTE ERGOMÉTRICO.

Material Utilizado:

- 1) Caixa de isopor
- 2) Gelo
- 3) Proveta de 50mL
- 4) Chicletes (Trident – Menta)
- 5) Guardanapo de papel
- 6) Eppendorfs, de 0,6 e 1,5mL, resfriados e já identificados (De acordo com o n.º de alíquotas).
- 7) Becker para descarte.
- 8) Suporte para eppendorfs.
- 9) Pipeta de 1000µL com ponteiras.
- 10) Descarte para ponteiras.
- 11) Relógio.

Procedimento de coleta da saliva.

Após a coleta basal da saliva (Já armazenada em mini-tubo pré-resfriados à 4°C), realizar os seguintes procedimentos para a coleta.

- I. A mesma goma de mascar utilizada na coleta de fluxo basal deverá ser utilizada para a coleta de saliva durante o teste.
- II. Ao final de cada estágio (30 segundos antes), pede-se ao voluntário que engula a saliva que está na cavidade bucal e comece a mascar a goma de mascar, armazenando a saliva até o momento de expeli-la (método de cuspe).
- III. Deve-se coletar uma quantidade suficiente para as posteriores análises (de acordo com a quantidade de saliva que irá se gastar nas análises).
- IV. A saliva poderá ser coletada 15" antes do término de cada estágio até 40" após o início do próximo estágio. Recomenda-se coletá-la o mais rápido possível.

-
- V. Após cada coleta de saliva, a mesma deverá ser colocada em um mini-tubo previamente resfriado a $+4^{\circ}\text{C}$.
 - VI. No máximo 3 horas após o término do teste, a saliva deverá ser centrifugada a $14\ 000\text{g}$, pré-resfriada a $+4^{\circ}\text{C}$ e congelada o sobrenadante a -20°C .
 - VII. Caso se tenha algum tipo de coloração avermelhada na amostra de saliva, principalmente no pélet, a respectiva deverá ser descartada, pois pode indicar uma contaminação com sangue.
 - VIII. Após o congelamento da saliva -20°C , deverá se garantir que até a análise não se tenha um aumento da temperatura das amostras.

P.S.: Todos os procedimentos devem ser seguidos à risca e os erros devem constar num relatório.
