

Biomarcadores salivares na avaliação do limiar anaeróbio

Artigo Original

Vanessa Neves de Oliveira (CREF 008580-/MG)

Mestranda em Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia
vanbio@yahoo.com.br

Miguel Júnior Sordi Bortolini M.Sc.(CREF 008837G/MG)

miggjrsb@yahoo.com.br

Ismair Teodoro Reis (CREF001245-G/MG)

Universidade Federal de Uberlândia
treis@ufu.br

Romeu de Paula Martins Silva Lamounier (CREF 008629 – G/MG)

Mestrando em Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia
romeupms@yahoo.com.br

Foued Salmen Espíndola (CRF-MG 4995)

Pós Doutor pela Yale University / Prof. Titular de Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.
foued@ufu.br

OLIVEIRA, V.N.; BORTOLINI, M.J.; REIS, I.T.; LAMOUNIER, R.P.M.S.; ESPÍNDOLA, F.S. Biomarcadores salivares na avaliação do limiar anaeróbio. *Fitness & Performance Journal*, v. 4, n. 2, p. 85-89, 2005

RESUMO: O trabalho teve como objetivo analisar o perfil eletroforético da alfa-amilase e concentração de proteína total salivar no exercício com incrementos de cargas até exaustão. Quinze voluntários (8 ciclistas, 4 jogadores de basquete e 3 praticantes de atividade física não específica), com média de idade de 22,5+/-5,06 anos, altura, 1,75+/-0,08 m e peso de 69,7+/-9,84 kg participaram do estudo. O teste foi realizado em ciclo ergômetro, entre os horários de 15:30 e 17:30 h. Todos os voluntários ingeriram \pm 400 mL de água, 30 minutos antes do teste. Este se iniciou com 50 Watts (W), aumentando de 50 em 50 W até 200 W; em seguida, aumentando de 25 em 25 W até a exaustão. Cada estágio teve duração de três minutos. A saliva estimulada foi coletada nos últimos segundos antes da mudança de estágio e o sobrenadante congelado após centrifugação (14.000g/10min). Determinou-se a concentração de proteína total e aplicou-se 3 μ g da proteína total em SDS-PAGE (poço/ estágio). Fez-se análise densitométrica (IOD) da banda relativa à alfa-amilase. A análise da IOD demonstrou significativa correlação ($r=0.88$) e obteve-se $p=0.00004$ para o teste das amostras dependentes, comparadas com limiar de proteína total salivar (PAT). Revelando um $r=0.86$ e um $p=0.00003$, quando comparado a IOD com limiar de lactato (AT), e um $r=0.88$ e um $p=0.025$, quando comparado o PAT e o AT. O estudo admitiu o nível de $p<0,05$ para a significância estatística.

Palavras-chave: limiar anaeróbio, eletroforese, amilase salivar, proteína total, cicloergômetro.

Endereço para correspondência:

Foued Salmen Espíndola Universidade Federal de Uberlândia – INGEB, Av. Pará, 1720, Bloco 2E 39ª Uberlândia – MG CEP 38400-982

Data de Recebimento: janeiro / 2005

Data de Aprovação: fevereiro / 2005

Copyright© 2008 por Colégio Brasileiro de Atividade Física, Saúde e Esporte.

Fit Perf J	Rio de Janeiro	4	2	85-89	mar/abr 2005
------------	----------------	---	---	-------	--------------

ABSTRACT

Salivary biomarkers for evaluation of anaerobic threshold

The objective of the present work was to analyze saliva total protein concentration and the electrophoretic profile of salivary alpha-amylase during exercise test to exhaustion. Fifteen volunteers (8 cyclists, 4 basketball players and 3 practitioners of non specific physical activity), with age 22.5 +/- 5.06 years; height 1.75 +/- 0.08 m; weight 69.7 +/- 9.84 kg participated in the study. The test was carried through in cycle ergometer, among the schedules of 15:30 and 17:30. All the volunteers ingested \pm 400 mL of water, 30 minutes before the test. The test started at a workload of 50 Watts (W), increasing 50W the load until 200W, after that increasing by 25 in 25W until the exhaustion. Each period of training had duration of three minutes. The stimulated saliva was collected in the last seconds of each stage and the supernatant was frozen after centrifugation (14.000g/10min). The saliva total protein was determined and three micrograms load in SDS-PAGE. Densitometric analysis (IOD) of the relative band to the alpha-amylase demonstrated significant correlation ($r=0,88$) with the total protein in saliva threshold (PAT) showing $p=0,00004$ for the test t-student of the dependent samples. The comparison of IOD with lactate threshold (AT) showing one $r=0,86$ and one $p=0,00003$, and $r=0,88$ and a $p=0,025$ when compared the PAT and the AT. The study admitted the level of $p < 0.05$ for the significance statistics.

Keywords: anaerobic threshold, electrophoresis, salivary amylase, total protein, cycle ergometer.

INTRODUÇÃO

O exercício induz o organismo a mudanças que podem ser detectadas através de biomarcadores plasmáticos e salivares. Estes biomarcadores são indicadores da resposta dos diferentes sistemas e tecidos corporais ao esforço físico. A mensuração do lactato sanguíneo é a forma clássica de avaliar o limiar anaeróbio (LA), o qual corresponde à intensidade de exercício em que a energia aeróbia é suplementada por mecanismos anaeróbios (WASSERMAN, 1986). Outros métodos além da medida do lactato sanguíneo apontam a saliva como uma fonte potencial de biomarcadores do exercício físico, além de representar uma forma não invasiva e de biossegurança classe I (SHIRTCLIFF et al., 2001). O limiar anaeróbio salivar (LAS) foi demonstrado em estudos de CHICHARRO et al., (1997,1998) e CALVO et al., (1997), pela análise da atividade da alfa-amilase salivar e pela concentração de eletrólitos da saliva. Nesta direção, investigamos os biomarcadores salivares em exercício progressivo em cicloergômetro, verificando que a determinação de proteína total da saliva total representa um novo método de obtenção do LAS (BORTOLINI-JÚNIOR, 2003).

O uso dos biomarcadores salivares ganhou popularidade na década passada, principalmente em pesquisa biomédica e psicológica (NATER et al., 2004). A medida da atividade da alfa amilase salivar como indicador de estresse pode substituir medidas convencionais de pressão arterial e frequência cardíaca, e mesmo medidas bioquímicas hormonais (YAMAGUCHI et al., 2004). As glândulas salivares não agem apenas como amplificadores a baixos níveis de noraepinefrina, mas também respondem mais rapidamente e são mais sensíveis que o cortisol. A atividade da alfa-amilase salivar eleva acentuadamente durante exercício físico progressivo, juntamente com os níveis de catecolaminas, e

RESUMEN

Biomarcadores salivares a la evaluación del umbral anaerobio

El objetivo del trabajo fue de analizar el perfil del electroforético en la concentración de la alfa amilase y de la proteína total salivar en el ejercicio con incrementos de La carga hasta el agotamiento. La muestra fue constituida por 8 ciclistas, 4 jugadores de baloncesto y 3 practicantes de actividad física no específica, con la edad 22.5 + 5.06 (años); talla (m): 1.75 + 0.08; peso (kilogramos): 69.7 + 9.84. La prueba fue llevada en cicloergometro, entre los horarios de 15:30 y 17:30 h. Todos los voluntarios injirieron \pm 400 ml de agua, 30 minutos antes de la prueba. Esto fue iniciada con 50 vatios (w), con progresión de carga de 50 en 50 W hasta 200 W, después los incrementos de carga fueron de 25 en 25 W hasta el agotamiento. Cada período de carga tuvo una duración de 3 minutos. La saliva fue estimulada, siendo recogida en los segundos antes del período de cambio de carga y El sobrenadante congelado después de centrifugalization (14.000g/10min). Se determinó la concentración de proteína total y se aplicó 3 μ g da proteína total em SDS-PAGE. Se realizó una análisis densitométrica (IOD) da banda relativa para alfa-amilase. El análisis de la IOD indicó significante correlación ($r=0.88$) y se obtuvo un $p=0.00004$ para o test "t-student" en las muestras dependientes, comparadas con el limiar de proteína total salivar (PAT). La comparación de IOD con el umbral del lactato (EN) que demuestra un $r=0.86$ y un $p=0.00003$, y $r=0.88$ y un $p=0.025$ cuando está comparado la PAT y LA. El estudio admitió el nivel de $p < 0,05$ para la significación estadística.

Palabras clave: umbral anaerobio, eletroforese, amilase salivar, proteína total y cicloergometro

responde a estressores fisiológicos (CALVO et al., 1997). Dessa forma, sua avaliação tem se tornado foco de estudo também na área da bioquímica do exercício.

A combinação da análise da proteína total da saliva total e da atividade da alfaamilase salivar pode também ser investigada em relação ao efeito do exercício sobre a expressão desta enzima durante o exercício. Para isto, uma ferramenta importante é a análise do perfil eletroforético das proteínas salivares através da identificação da massa molecular relativa (Mr) em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e as alterações deste perfil em resposta ao exercício. O perfil eletroforético das proteínas da saliva total em humanos foi caracterizado em SDS-PAGE por SCHWARTZ (1995). Estudos demonstraram que a saliva total contém aproximadamente 40 bandas de proteínas, as quais podem ser separadas em 3 grupos: Zona A, 215-45 KDa; Zona B, 45-25 KDa e Zona C, < 20 KDa. As duas bandas da amilase (55,5 e 47,5 KDa), juntamente com a albumina, proteína rica em prolina, MG2 e G1, estão localizadas na Zona A do gel (SREEBNY & ZHU, 1996). Embora esta abordagem não tenha sido relatada em relação ao exercício físico, ela é utilizada em estudos associados com prevalência de cáries (BANDERAS et al., 2002), em diagnósticos da síndrome de Sjögren 's (SREEBNY & ZHU, 1996) e em avaliações de polimorfismo (BOAN & CAEIRO, 1998).

Este trabalho teve como objetivo verificar a concentração da alfa-amilase em SDS-PAGE, com a mesma amostragem em que se determinou o limiar de proteína total da saliva total (PAT) (BORTOLINI-JÚNIOR, 2003). Além disso, observou, também, a análise densitométrica da banda da alfa amilase em relação à cinética do lactato durante exercício físico até a exaustão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Voluntários

Fizeram parte do estudo, 8 ciclistas, 4 jogadores de basquete e 3 praticantes de atividade física não específica. A média (\pm DP) de idade, peso e altura dos voluntários foi: $23,6 \pm 4,9$ anos, $72,3 \pm 7,9$ Kg, $1,79 \pm 0,09$ cm, respectivamente.

Os voluntários aptos, cientes e interessados em participar do projeto assinaram um termo de consentimento, estando cientes de todos os procedimentos a serem tomados e executados antes, durante e após os testes. O protocolo experimental teve início somente após o recebimento do parecer (n^o 007/2003) de aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia.

Teste de esforço com incremento de carga em ciclo ergômetro.

Os testes foram realizados em ciclo ergômetro (Ergofit 167, German) entre às 15:30 e às 17:30 horas, com a temperatura da sala mantida entre 24 e 26°C. A frequência cardíaca foi mensurada durante o teste pelo monitor de frequência cardíaca (Polar S610TM, Polar Electro Oy, Finlândia). Todos os voluntários ingeriram \pm 400 mL de água, 30 minutos antes do teste. Iniciou-se o teste com 50 Watts (W), aumentando de 50 em 50 W até 200 W e, em seguida, aumentando de 25 em 25 W a cada estágio (três minutos cada) até exaustão. A frequência de rotação do pedal deveria ser mantida entre 68 e 75 rpm. Os testes foram interrompidos: 1) voluntariamente pelo voluntário; 2) se a rotação do pedal não foi mantida; ou 3) quando a frequência cardíaca permaneceu acima de 90% da sua capacidade máxima.

Coleta e Mensuração do lactato sanguíneo.

Utilizando luvas cirúrgicas, e após assepsia local com álcool, foi feita punção do lobo da orelha por meio de lanceta descartável. A primeira gota de sangue foi desprezada para evitar contaminação com o lactato eliminado no suor produzido pelas glândulas sudoríparas, e a seguir 25 μ L de sangue arterializado foram coletados, utilizando-se de capilares de vidro heparinizados e calibrados. O sangue coletado foi depositado em microtubos contendo 50 μ L de fluoreto de sódio 1% (que, por ser hipotônico, provoca a hemólise e também a inibição da enzima glicolítica enolase, interrompendo assim a atividade glicolítica, além de contribuir para evitar a coagulação sanguínea). O lactato sanguíneo foi analisado por método eletro-enzimático (lactímetro USI 1500 Sport da Yellow Springs).

Coleta da saliva e dosagem da proteína total

A saliva estimulada por goma de mascar (Trident®-menta) foi coletada pelo método de cuspe segundo NAVAZESH (1993). Os voluntários enxaguavam a boca várias vezes com água destilada, para limpeza de "debris" celulares. Um minuto antes do término de cada estágio, o voluntário engolia a saliva e começava a mastigar o chiclete. A coleta foi feita nos últimos trinta segundos de cada estágio. A coleta da saliva iniciava 30 segundos antes de terminar o estágio e a saliva era colocada em mini-tubos pré-resfriados (4°C) durante um tempo máximo de três horas e centrifugada a 12.000g. O sedimento era descartado e o sobre-

nadante congelado a -20°C. A determinação da proteína total salivar foi feita pelo método de Bradford (1976).

Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida foi realizada como descrito por Laemmli & Favre (1973). Foram utilizados mini-géis com gradiente de 5 a 16 % de poliacrilamida. As amostras foram preparadas pela adição de 10% do volume de tampão da amostra (TA) [10X] (SDS 75%, sacarose 20%, tampão de equilíbrio 31mM, β -mercaptoetanol 19%, 11mM EGTA-K e bromofenol blue 0,25%). Aplicou-se 3 μ g da amostra em mini-géis e corridas a 35mA em tampão eletrodo (100mM Tris pH 8,3, 7.8 mM EDTA, 770 mM glicina, SDS 3%). Após a corrida, as bandas das cadeias polipeptídicas foram reveladas pela coloração do gel com comassie blue R250 em solução de metanol 50% e ácido acético 10%. As proteínas foram marcadas pelo tamanho e intensidade calorimétrica das bandas e identificadas pela sua mobilidade relativa no gel em relação ao padrão de massa molecular (SDS -6H, Sigma).

Densitometria ótica

Os plots (bandas no gel) de amilase das amostras de saliva total de cada estágio do exercício físico foram quantificados e analisados, quanto às suas densidades óticas, no programa (Image Master VDS Software versão 2.0). O limiar anaeróbio individual (LAI) foi determinado por inspeção visual tanto para a análise do lactato sanguíneo quanto para os valores do índice de densitometria ótica (IOD).

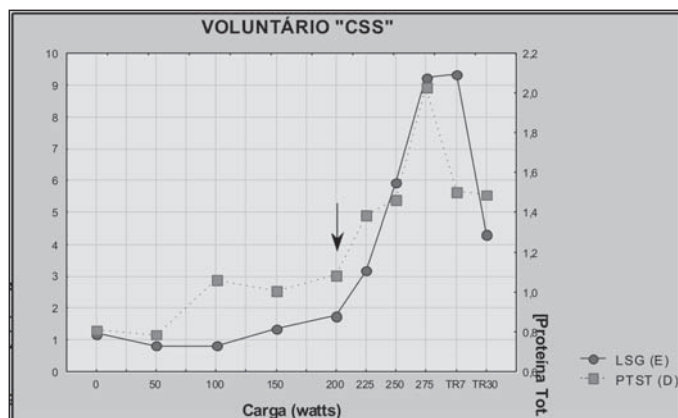
Tratamento Estatístico

Utilizou-se a estatística descritiva, com os valores médios e desvio padrão. O teste t para observar a existência ou não de diferença significativa para $p < 0,05$, entre os valores médios dos limiares (LA, PAT e IOD). O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para estabelecer a correlação entre LA, PAT e IOD.

RESULTADOS

Os voluntários avaliados neste estudo apresentaram idade de $23,6 \pm 4,9$ anos, massa corporal de $72,3 \pm 7,9$ e altura de $1,79 \pm 0,09$ m. A análise da correlação entre os valores médios

Gráfico 1 - Ponto de inflexão da reta "limiar anaeróbio salivar e de lactato"



da concentração de lactato sanguíneo [para manter o padrão com as outras ocorrências] com a concentração de proteína total da saliva total obtidos dos voluntários avaliados em cada estágio do exercício e repouso, apresentou $r=0,77$ e $p=0,0004$. O comportamento das duas variáveis demonstrou através da correlação obtida que a avaliação do lactato pode ser predita pela análise da proteína total da saliva total embora seus valores sejam significativamente diferentes ($p<0,05$).

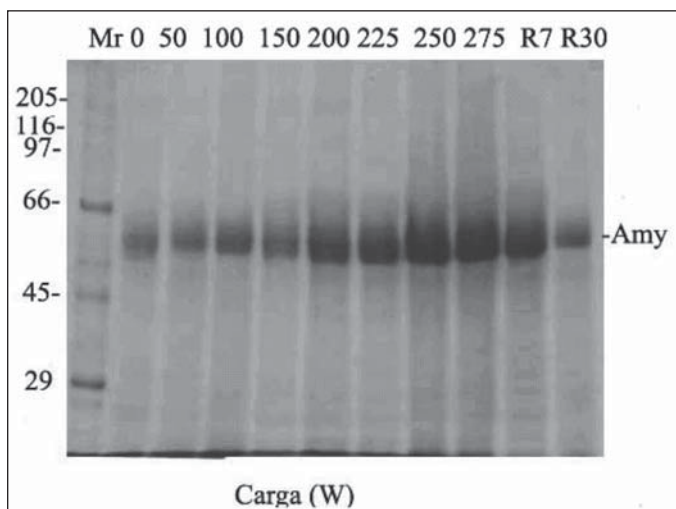
O gráfico 1 representa a relação entre os valores de lactato e a concentração de proteína total salivar de um voluntário. A partir da carga de 200W, tanto a concentração de lactato quanto a de proteína total da saliva apresentam um ponto de inflexão na curva (seta), considerada como o ponto de limiar anaeróbio de lactato (LA) e de proteína total salivar (PAT).

No eixo Y, à esquerda, estão os valores de Lactato plasmático em mmol/L do voluntário "CSS" a cada estágio. No eixo Y, à direita, estão os valores de proteína total da saliva total em mg/mL. No eixo X estão os estágios de exercício de 1 a 7, sendo "0" os valores de repouso e os sucessivos de incrementos de carga. O "TR7" e "TR30" foram amostras coletadas 7 e 30 minutos após o término do teste. A seta indica o ponto de LA.

As figuras 1 e 2 apresentam a amostra do perfil de proteínas da saliva total dos diferentes estágios de exercício e repouso para dois voluntários através da eletroforese em poliacrilamida em condição desnaturante. A análise visual das bandas das isoformas da alfa amilase salivar em SDS-PAGE (Amy, fig 2 e 3) revela que estas bandas se localizam na zona A, que corresponde à faixa de separação de polipeptídeos de 215 – 45 kDa. As duas bandas (Amy, 55,5 e 47,5 kDa) mais intensamente coradas no gel têm sua concentração aumentada no decorrer do exercício. Com cinco e 30 minutos de repouso após exercício ocorre redução da concentração da banda de alfa amilase.

SDS-PAGE da saliva total do voluntário "ACS". A faixa mais intensa do gel representa as isoformas da α -amilase (AMY) e sua concentração relativa nos sucessivos estágios de exercício (50, 100...). R5 e R30 são amostras coletadas durante o 7º e 30º minutos após o exercício. Mr = padrão de peso molecular

Figura 1 - Comportamento da alfa-amilase em gel de eletroforese do voluntário "CSS"



SDS-PAGE da saliva total do voluntário "CSS". A faixa mais intensa do gel representa as isoformas da α -amilase (AMY) e sua concentração relativa nos sucessivos estágios de exercício (50, 100,...) R7 e R30 são amostras coletadas durante o 7º e 30º minutos após o exercício. Mr = padrão de massa molecular relativa.

A intensidade da banda da alfa amilase foi quantificada para uma amostragem de três voluntários, pelo índice de densitometria ótica (IOD). A análise da IOD determinou um coeficiente para correlação de Pearson significativa ($r=0,88$) e $p=0,00004$ para o teste t-student das amostras dependentes, comparadas com limiar de proteína total salivar (PAT). Mostrando $r=0,86$ e $p=0,00003$, quando comparado o IOD com o limiar de lactato (AT), e $r=0,88$ e $p=0,025$ quando comparado o PAT e o AT.

O gráfico 2 mostra os resultados da IOD em relação à concentração de proteína total da saliva, comprovando os resultados por inspeção visual. Além disso, a seta no gráfico 2 indica a possibilidade de determinar um limiar de IOD semelhante ao obtido pela análise da proteína total.

No eixo Y, à esquerda, estão os valores de IOD do voluntário "CSS" a cada estágio. No eixo Y, à direita, estão os valores de proteína total da saliva total em mg/mL. No eixo X estão os estágios de exercício de 1 a 7 sendo "0" os valores de repouso e os sucessivos incrementos de carga. O "TR7" e "TR30" foram amostras coletadas 7 e 30 minutos após o término do teste. A seta indica o ponto de LA.

DISCUSSÃO

Através da análise densitométrica das banda da α -amilase em SDS-PAGE, constatou-se que a concentração relativa da α -amilase no gel, relativa aos sucessivos estágios de exercício, aumenta de forma linear num primeiro instante, até se observar um ponto de inflexão na curva (ponto de inflexão). O "ponto de limiar" observado em SDS-PAGE coincide com aqueles referentes á intensidade do limiar anaeróbio de lactato e limiar salivar (proteína total).

Com base no trabalho de SCHWARTZ (1995), que caracterizou o perfil eletroforético das proteínas totais da saliva, pode-se localizar a α -amilase no gel. As figuras 1 e 2 do presente trabalho, revelam as bandas polipeptídicas da saliva total coradas com

Figura 2 - Comportamento da alfa-amilase em gel de eletroforese do voluntário "ACS"

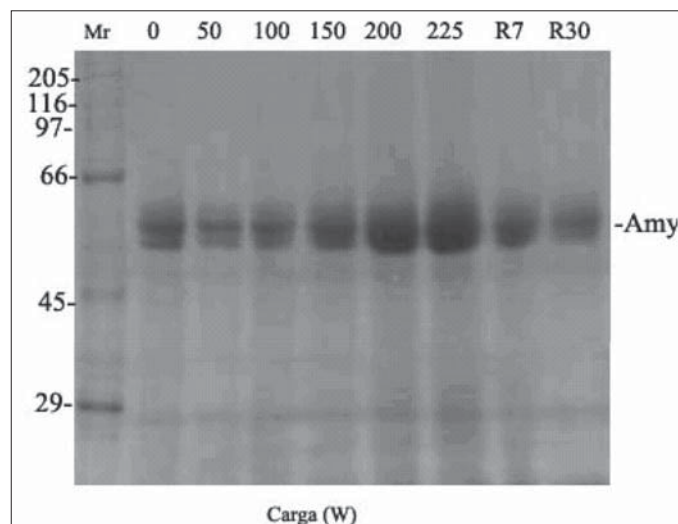
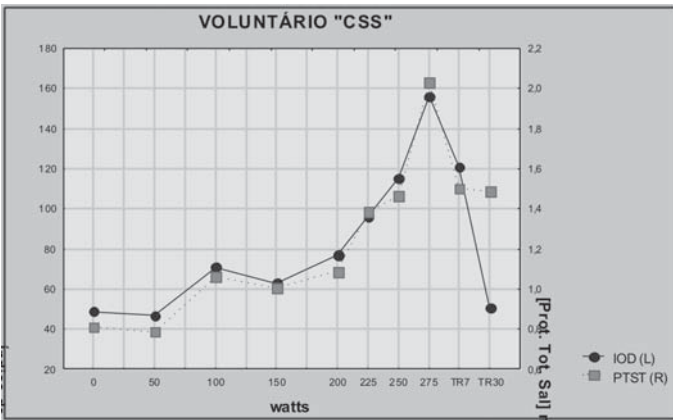


Gráfico 2 - Ponto de inflexão da reta "limiar anaeróbio salivar"



menos intensidade, com exceção das bandas de 55,5 e 47,5 kDa, correspondentes às isoformas da α -amilase. A menor intensidade de coloração das outras bandas foi devido à baixa concentração de proteínas aplicadas no gel (3 μ g) para permitir uma melhor visualização e quantificação das bandas da α -amilase. Esta concentração foi ideal para analisar o comportamento da α -amilase, uma vez que esta proteína é a mais abundante na saliva total.

O sistema nervoso simpático tem sua atividade aumentada progressivamente com a intensidade do exercício (STAINSBY & BROOKS, 1990), sendo o principal responsável pelas alterações causadas nos componentes salivares no decorrer do exercício com cargas crescentes (CHICHARRO et al., 1998). Entretanto, respostas referentes aos limiares anaeróbios de lactato e limiar salivar não representam uma resposta casual, mas uma consequência do aumento na concentração das catecolaminas plasmáticas.

WALSH et al. (2003), mostraram que durante exercício físico progressivo a 60% do VO₂máx e sob condições de temperatura elevada (30°C), ocorre uma diminuição do fluxo salivar e um aumento da concentração de proteína total salivar, em consequência de um estado de desidratação durante atividade física. Neste estudo, tomou-se cuidado com a manutenção de um bom estado de hidratação antes do exercício e com a manutenção da temperatura ambiente entre 24 a 26°C. Isto provavelmente sugere uma maior influência da atividade simpática sobre o aumento da concentração da proteína total. Além disso, as secreções celulares não são os únicos elementos glandulares que respondem à estimulação pela inervação simpática. As células mioepiteliais e os vasos sanguíneos das glândulas também respondem a tais inerações, e suas respostas podem modificar a quantidade e a composição da saliva elaborada (GARRET, 1979). Desse modo, a estimulação simpática dos vasos sanguíneos pode produzir uma marcada vasoconstrição, limitando o suprimento sanguíneo da glândula de tal forma que a taxa de secreção seja reduzida (SHANNON et al., 1974). Por outro lado, para análise do perfil eletroforético das proteínas salivares também se tomou o cuidado de aplicar a mesma concentração de proteína total da saliva total para cada amostra, possibilitando assim uma correção do efeito concentrador causado pela diminuição do fluxo salivar durante o exercício.

Este trabalho mostrou que, além da atividade aumentada da alfa-amilase na saliva total, sua concentração na saliva aumenta progressivamente com a intensidade do exercício. Além do mais, quando os valores do índice de densitometria ótica (IOD) são plotados contra os estágios de exercício, observa-se a existência de um ponto de limiar que coincide com o limiar salivar (Thsa).

CONCLUSÃO

De acordo com os achados do presente trabalho, sugere-se que o perfil da α -amilase em SDS-PAGE possa ser utilizado como um parâmetro na avaliação e análise do limiar anaeróbio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANDERAS, J. A.; ZACARIAS, I. G. Electrophoretic Analysis of Whole Saliva and Prevalence of Dental Caries. A Study in Mexican Dental Students. *Archives of Medical Research*, v.33, p.499-505, 2002.
- BOAN, F.; CAEIRO, J. L. Salivary enzyme polymorphisms (Set, Sgd and AMY1) in the Galician population. *Human Heredity*, v.38, n.2, p.83-90, 1988.
- BORTOLINI-JUNIOR, J.M. A. *Biomarcadores Salivares do Exercício Físico para Determinação do Limiar Anaeróbio Humano*. Dissertação de Mestrado em Genética e Bioquímica –Uberlândia: UFU, 2003.
- 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.
- CALVO, F.; CHICHARRO, J. L.; BANDRÉS, F.; LUCÍA, A. PERES, M.; ÁLVARES, J.; MOJARES, L. L.; VAQUERO, A. F.; LEGIDO, J.C. Anaerobic threshold determination with analysis of salivary amilasy. *Canadian Journal of Applied Physiology*, v.22, n.6, p.553-561, 1997.
- CHICHARRO, J. L.; PEREZ, M.; VAQUERO, A. F.; LUCIA, A.; LEGIDO, J. C. Lactic threshold vs ventilatory threshold during a ramp test on a cycle ergometer. *The Journal of Sports and Medicine and Physical Fitness*, v.37, n.2, p.117-21, jun 1997.
- CHICHARRO, J. L.; LUCIA, A.; PEREZ, M.; VAQUERO, A. F.; URENA, R. Saliva composition and exercise. *Sports Medicine*, v.26, n.1, p.17-27, jul, 1998.
- GARRET, J. R.; EMMELIN, N. Activities of salivary myoepithelial cells: A Review. *Med Biol*, v.57, p.1-28, 1979.
- LAEMMLI, U.K.; FAVRE, M. Maturation of the head of bacteriophage T4. *Journal of Molecular Biology*. v.80, p.575-599, 1973.
- NATER, U.M.; ROHLEDER, M.; GAAB, J.; BERGER, S.; JUD, A.; KIRSCHBAUM, C.; EHLERT, U. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *International Journal of Psychophysiology*, march, 2004.
- 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.
- SCHWARTZ, S.S.; ZHU, W.X.; SREEBNY, L.M. Sodium Dodecyl Sulphate- Poliacrylamide Gel Electrophoresis of Human Whole Saliva. *Archives of Oral Biology*, v.40, n.10, p.949-58, 1995.
- SHANNON, I.L.; SUDDICK, R.P.; DOWD, F.J.Jr. Saliva: composition and secretion. *Monographs in Oral Science*, v.2, p. 1-103, 1974.
- SHIRTCLIFF, 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 immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology*, v.26, n.2, p.165-173, feb, 2001.
- SREEBNY, L.M.; ZHU, W.X. The use of Whole Saliva in the differential Diagnosis of Sjogren's Syndrome. *Advances in Dental Research*, v.10, n.1, p. 17-24, 1996.
- STAINSBY, W. N.; BROOKS, G.A., Control of lactate metabolism in contracting muscles and during exercise. *Exercise and Sports Sciences Reviews*, v.18, p.29-63, 1990.
- WALSH, N.P.; MONTAGUE, J.C.; CALLOW, N.; ROWLANDS, A.V. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. *Archives of Oral Biology*, August, 2003.
- WASSERMAN, K.; HANSEN, J.E.; SUE, D.Y.; WHIPP, B.J. Principles of exercise testing and interpretation. *Lea & Febiger*, Philadelphia, 1986.
- YAMAGUCHI, M.; KANEMORI, T.; KANEMARU, M.; TAKAI, N.; YASUFUMI, M.; YOSHIDA, H. Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. *Biosensors and Bioelectronics*, n.20, p.491-497, 2004.