



Fluido oral: avanços tecnológicos e implicações clínicas na espécie suína

[*Oral fluid: technological advances and clinical implications in swine*]

"Revisão/ Review"

RIAA Baptista^{1*}, SA Barbosa Junior¹, CN Barbosa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Resumo

O interesse pelos métodos laboratoriais à base do fluido oral tem aumentado e os estudos apontam como uma alternativa nas análises sanguíneas e séricas. Diversos patógenos podem ser avaliados pela reatividade de proteínas e detecção de antígenos. Na espécie suína, em especial, o uso do fluido oral está ampliando as perspectivas de desenvolvimento e aplicação nos diagnósticos laboratoriais, monitoramentos de rebanho, bem como a avaliação do bem-estar animal. A proposta desta revisão é fazer uma abordagem sobre a colheita do fluido oral, o histórico e aplicações dos métodos laboratoriais, bem como a identificação dos patógenos, das imunoglobulinas, das proteínas e hormônios esteróides no fluido oral da espécie suína.

Palavras-chave: Bem-estar animal, diagnóstico, fluido oral, patógenos, suíno.

Abstract

The oral fluid-based laboratory methods interest has increased and the studies point to an alternative to blood and serum analyzes. Several pathogens can be assessed by protein reactivity and antigen detection. Particularly in swine, the use of oral fluid is broadening the perspectives of development and application in laboratory diagnostics, in monitoring herd and the assessment of animal welfare. The purpose of this review is to make an approach to the collection of oral fluid, historical and applications of laboratory methods and identification of pathogens, of immunoglobulins, proteins and steroid hormones in oral fluid of swine.

Key words: Animal welfare, diagnostic, oral fluid, pathogens, swine.

Introdução

O fluido oral (FO) é um líquido incolor e viscoso que resulta da combinação entre a saliva e o transudato da mucosa oral. A saliva é secretada pelas principais glândulas parótida, submandibular e sublingual, enquanto o transudato da mucosa oral tem origem nos tecidos gengivais e nos capilares da mucosa oral (SISSON et al., 1975; HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; McKIE et al., 2002; DeLIMA e VAN DYKE, 2003).

Um dos primeiros registros científicos envolvendo o FO foram realizados em 1880 por

Sternberg ao descobrir a presença do *Diplococcus pneumoniae* em sua própria saliva (SHAFIQ e MALHOTRA, 2012). Na medicina veterinária, as primeiras publicações sobre o FO foram feitas por Roux e Nocard (1890) ao avaliarem de forma indireta o período de excreção do vírus rábico na saliva de cães experimentalmente infectados.

Atualmente, na medicina humana, o uso do FO é assegurado por uma ampla base de investigações científicas (KAUFMAN e LAMSTER, 2002). Os estudos apontaram que diversos patógenos de grande importância para a

*Autor para correspondência/Corresponding author: Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Brasil. CEP: 52171-900. E-mail: raissaivna@yahoo.com.br

saúde humana, como vírus do sarampo, da caxumba, da hepatite A, B e C podem ser avaliados pela reatividade de anticorpos, bem como pela a identificação de antígenos ou ácidos nucléicos (HELFAND et al., 1996; AMADO et al., 2006; WARRENER e SAMUEL, 2006).

Na medicina veterinária, além dos suínos, foram relatados vários estudos sobre a identificação de patógenos e anticorpos no FO de felinos, caninos, equinos, ovinos e bovinos (PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010). A partir das literaturas publicadas é possível observar que, ultimamente, as pesquisas sobre o FO na espécie suína têm se desenvolvido mais rapidamente do que nas demais espécies domésticas. Acredita-se que a importância econômica da cadeia produtiva suína e a facilidade da colheita das amostras biológicas têm impulsionado e facilitado o desenvolvimento dos métodos laboratoriais à base do FO.

As recentes publicações envolvendo o FO na espécie suína têm gerado amplas perspectivas no desenvolvimento de métodos laboratoriais, bem como a sua aplicação nos diagnósticos laboratoriais, nos monitoramentos de rebanhos e avaliação do bem-estar animal (PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010; BAPTISTA, 2012). Na América do Norte, já é possível identificar essa tendência, onde o número de testes imunoenzimáticos e moleculares à base do FO aumentou de 10.329 para 52.000 (KITTAWORNRAT et al., 2013).

Outro aspecto relevante, que confere interesse crescente ao uso do FO como amostra clínica é o método de colheita utilizando as cordas de algodão. Trata-se de um procedimento simples, não-invasivo e de baixo custo (PRICKETT et al., 2008; PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010; BARBOSA et al., 2013). Essas características facilitam o desenvolvimento e a utilização dos métodos à base do FO na suinocultura e abre um amplo campo de investigações de importância para produção animal.

A proposta desta revisão é fazer uma abordagem sobre o histórico e aplicações dos métodos laboratoriais à base do FO, bem como a identificação dos patógenos, das imunoglobulinas, das proteínas e do hormônio cortisol na espécie suína.

Colheita do fluido oral

O suíno é um animal curioso e de natureza exploratória. Essas características favorecem o

interesse do animal em se aproximar dos materiais fornecidos para a coleta do FO (GRANDIN e JOHNSON, 2010; BAPTISTA, 2012; BARBOSA et al., 2013).

A matéria prima utilizada para a colheita do FO é o algodão devido a sua alta capacidade absorviva em relação aos materiais sintéticos. O dispositivo utilizado na colheita pode ser em forma de corda de algodão, almofada de algodão ou ainda haste composta por extremidade de algodão (DALLA COSTA et al., 2008; HILLMANN et al., 2008; BARBOSA et al. 2013).

Nos suínos, a colheita do FO ocorre por meio de dispositivos que estimulam a mastigação, como é o exemplo das cordas de algodão. Pode-se também utilizar uma solução atrativa, como açúcar, para que o animal seja atraído e assim, efetuar a mastigação e deposição do FO no dispositivo de colheita (ZIMMERMAN et al. 2008; BARBOSA et al., 2011).

A colheita ainda pode ser realizada com ou sem a presença de um operador. No primeiro caso, o operador segura a corda ou outro dispositivo de colheita, e, no segundo caso, o dispositivo de colheita pode estar somente pendurado em local e altura adequadas para o acesso do suíno (PRICKETT et al., 2008; BAPTISTA, 2012; BARBOSA et al., 2013).

O FO pode ser colhido individualmente, por animal, ou então, em grupos, onde há a representação coletiva por baía. Para as colheitas em baias com múltiplos animais é necessário garantir o acesso de todos ao dispositivo de colheita para se obter uma amostra representativa (BARBOSA et al., 2013).

Barbosa et al. (2013) realizaram a colheita do FO de suínos mestiços nas diferentes fases de produção e avaliaram a viabilidade de implantação do método, tempo de colheita, volume, qualidade de amostras e comportamento do animal. Utilizou-se como dispositivo de colheita a corda de algodão e os resultados revelaram que os animais mostraram-se interessados pelo método havendo competição para mordê-la, possibilitando a obtenção de amostras do FO sem estresse.

Conceitos gerais

O FO é o termo utilizado para nomear o líquido incolor e viscoso presente na cavidade oral dos seres humanos e animais. Trata-se de uma mistura complexa entre a saliva e o transudato da mucosa oral (McKIE et al., 2002; DeLIMA; VAN DYKE, 2003).

Por meio dos capilares localizados na mucosa oral e gengival o transudato do soro sanguíneo alcança a cavidade oral, sendo nomeado de transudato da mucosa oral, quando atravessa a mucosa oral e de fluido gengival crevicular, quando atravessa a mucosa gengival (DeLIMA E VAN DYKE, 2003; PRICKETT E ZIMMERMAN, 2010). Outro termo utilizado é “saliva total” para designar o fluido obtido da boca por expectoração (HODINKA et al., 1998).

Na literatura, o transudato da mucosa oral também é conhecido pelos termos “fluido crevicular”, “fluido crevicular gengival” ou “fluido crevicular salivar”. A excreção ocorre por transudação na gengiva e por todo o tecido da mucosa oral (HODINKA et al., 1998).

O conteúdo do transudato da mucosa oral é semelhante ao encontrado no plasma sanguíneo e incluem quantidades significativas de anticorpos específicos. Os autores Madar et al. (2002) descreveram que as concentrações de Imunoglobulinas (Ig) no transudato da mucosa oral são bem mais elevadas do que no FO. Segundo Mestecky et al. (2005), o fluido crevicular quando misturado à saliva, chega a uma diluição compreendida entre 1:1000 e 1:500.

Aplicação no fluido oral

Patógenos

No início do século XX foram publicados diversos artigos que relatavam a presença de microrganismos no FO humano. Em 1917, Howe pesquisou na saliva os microrganismos associados com a cárie dental.

Na década de quarenta foi estudada em humanos a excreção do vírus por diferentes vias de eliminação. Albert Sabin e Robert Ward publicaram um estudo sobre a excreção do vírus da poliomielite em secreções nasais e orais, porém não foi possível recuperá-lo (SABIN e WARD, 1941). Em 1948, Henle et al. isolaram o vírus da caxumba a partir da saliva de pacientes infectados.

Uma das maiores descobertas do final do século XX foi realizada por Groopmen et al. (1984), cujo vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi isolado nas amostras de saliva de humanos infectados.

A literatura tem descrito a presença de patógenos de importância econômica para suinocultura que podem ser identificados pela reatividade de anticorpos específicos e/ou detecção de antígenos ou ácido nucléico (PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010). Stallknecht et al. (1999),

demonstraram que o vírus da estomatite vesicular (VSV) pode ser recuperado do FO em suínos naturalmente infectados. Os autores Eblé et al. (2004) conseguiram identificar sequências específicas do vírus da febre aftosa (O TAW 3/97) pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no FO de suínos experimentalmente infectados dez dias após a infecção.

Prickett et al. (2008) avaliaram o nível e a persistência do vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) no soro sanguíneo e FO pela técnica de RT-PCR em tempo real (qRTPCR) em três grupos de suínos com idades acima de quatro semanas. Os animais foram infectados e após 63 dias a persistência e o nível do PRRSV foram determinados no soro e no FO. O material genético viral foi identificado após a infecção no soro por cinco semanas, enquanto que no FO, por quatro semanas. Os resultados sugeriram a utilização do FO como amostra clínica para o monitoramento dos animais contra o PRRSV.

Detmer et al. (2011) investigaram a presença do vírus da influenza A no FO de suínos em condições naturais e experimentais pelas técnicas laboratoriais de PCR em tempo real e isolamento viral em células MDCK (Madin-Darby canine kidney). De acordo com os resultados nenhuma amostra de FO de suínos inoculados foi positiva para o isolamento viral, porém, 15 das 16 amostras foram positivas pela PCR em tempo real.

Prickett et al. (2011) investigaram a presença do circovírus suíno 2 (PCV2) no FO pela técnica de PCR em tempo real. Foram utilizados 24 suínos inoculados experimentalmente pelo PCV2 e avaliados por 98 dias pós-inoculação. Os resultados demonstraram que a partir do segundo dia pós-inoculação já foi possível detectar o PCV2 em amostras de FO, e que este método pode ser efetivamente utilizado para monitorar os animais infectados pelo PCV2.

Costa et al. (2012), pesquisaram no FO o material genético do *Actinobacillus pleurionemoniae* (APP), *Haemophilus parasuis* (HP) e *Streptococcus suis* (SS) pela técnica de PCR convencional e específica para cada agente etiológico. Os 80 suínos inoculados experimentalmente e distribuídos aleatoriamente em grupos foram avaliados no primeiro dia pós infecção e a partir de então, cada semana, por sete semanas consecutivas. O APP foi detectado no primeiro e sétimo dias pós infecção e o HP e SS por serem colonizadores normais do trato respiratório suíno

foram detectados em todos os momentos do estudo. Os autores concluíram que o FO tem potencial para ser uma ferramenta de triagem na detecção de patógenos bacterianos em suínos.

Recentemente, Giménez-Lirola et al. (2013) reportaram a presença da *Erysipelothrix rhusiopathiae* no FO. Foram avaliadas 154 amostras de FO, sendo animais infectados (n=112) e não-infectados (n=32). No primeiro dia pós infecção o patógeno foi recuperado por isolamento em 28,6% (2/7) das baias e pela técnica de PCR em tempo real o DNA bacteriano foi detectado em 100% (7/7) das baias. Os resultados sugeriram que o PCR é um método efetivo e pode ser usado para detectar precocemente a infecção no hospedeiro.

Imunoglobulinas

Nos animais e humanos as imunoglobulinas (Igs) e os vários patógenos podem ser detectados no FO dos indivíduos infectados. Os anticorpos IgM, IgA e IgG são produzidos nas glândulas salivares locais e tecidos linfóides, mas a fonte primária de anticorpos no FO é o transudato da mucosa (BRANDTZAEG, 2007). A presença de anticorpos no FO foi demonstrada em 1909 por Pollaci e Ceraulo. Os pesquisadores relataram a presença de aglutinação específica para *Micrococcus melitensis* (*Brucella melitensis*) no FO dos pacientes diagnosticados com a febre de Malta (PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010).

A transferência de anticorpos presentes no soro sanguíneo para o FO, bem como sua correlação, se iniciaram na década de 60. Os primeiros experimentos tiveram como foco as doenças humanas e, principalmente, aquelas relacionadas com o periodonto. Em 1972, Shillitoe e Lehner determinaram a relação entre as concentrações de IgA, IgM e IgG pelo método de Radio-Imunoensaio (RIA) presentes no soro sanguíneo e fluido crevicular em 25 pacientes humanos com doença periodontal. Os resultados revelaram que existe razão entre as IgA, IgM e IgG no soro e fluido crevicular e estes valores seriam de 2; 2,6 e 3,7, respectivamente.

Ainda na década de 70 foram utilizados modelos experimentais animais com o objetivo de compreender os mecanismos de transferências das imunoglobulinas do soro sanguíneo para a cavidade oral. Em 1978, Challacombe e colaboradores publicaram um estudo sobre a migração das imunoglobulinas do plasma para a cavidade oral em 12 macacos-rhesus. As IgA diméricas, IgG e IgM marcadas radioativamente

foram administradas por via intravenosa, e, posteriormente, foram colhidas amostras de sangue, “saliva misturada” (FO) e lavado do fluido crevicular em 0, 30 minutos, 1, 2, 4 e 24 horas após sua administração. Os resultados demonstraram que, no sangue, todas as Igs estudadas atingiram a sua maior concentração aos 30 minutos de sua administração e apresentaram menor concentração às 24 horas. No lavado do fluido crevicular, a IgA apresentou maior e menor concentração às 4 e 24 horas, respectivamente. A IgM apresentou quantidade significativa somente após 2 horas de administrada, maiores e menores níveis às 4 e 24 horas, respectivamente. A IgG foi detectada aos 30 minutos e apresentou maior concentração 24 horas após sua administração. No FO, as Igs estudadas foram encontradas em 30 minutos de administradas no sangue, com valores máximos entre 2 e 4 h. De acordo com os autores, a diferença entre o tempo de detecção das Ig está associada à concentração sérica das mesmas, bem como o seu peso molecular. Segundo Höfling e Gonçalves (2007), a IgA dimérica e IgG tem respectivamente, 385 kDa e 146 kDa, a IgM apresenta 970 kDa.

O primeiro estudo na espécie suína foi realizado por Corthier em 1976, cujo objetivo foi detectar os anticorpos em secreções da cavidade oral. Nesse trabalho foi comprovada a presença dos anticorpos contra o Vírus da Peste Suína Clássica (SFV) nas secreções da faringe. Na década de 80 estudaram-se a excreção de IgA, IgM e IgG na glândula salivar após a inoculação do Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGE) e a detecção foi feita pelo método de RIA (DeBUYSSCHER e BERMAN, 1980).

Atualmente, trabalhos estão sendo desenvolvidos em diversas espécies animais com ênfase no diagnóstico das doenças de interesse para a medicina veterinária (PRICKETT e ZIMMERMAN, 2010). Em suínos, foram identificadas em amostras do FO as imunoglobulinas específicas para o PRRSV, Vírus da Influenza A (IAV) e PCV2 em grupos sob condições experimentais e de campo (KITTAWORN RAT et al., 2013).

Kittawornrat et al. (2012) avaliaram a performance diagnóstica de um ensaio imunoenzimático (ELISA) comercial modificado para detecção de imunoglobulinas anti-PRRSV no FO suínos. Foram colhidas amostras de animais inoculados experimentalmente por PRRSV e naturalmente infectados (animais de campo). De acordo com os resultados, a IgM e IgA foram

detectadas nas amostras de FO de animais inoculados, mas não em amostras de animais de campo. Em contraste, a IgG foi detectada em amostras experimentais e de campo. O estudo sugeriu que o ELISA para detecção do IgG no FO pode ser aplicado nos plantéis de suínos comerciais e forneceu um monitoramento eficiente e com custos reduzidos.

Panyasing et al. (2013) estudaram a resposta imunológica à nucleoproteína do vírus da Influenza A (IAV) em 82 suínos pelo teste de ELISA. Após a inoculação da nucleoproteína viral, foram avaliadas as respostas da IgM, IgA e IgG nas amostras de soro sanguíneo e no FO de animais vacinados e não-vacinados após 42 dias da inoculação. O estudo demonstrou alta correlação ($p < 0.0001$, $r = 0.810$) entre as respostas da IgM no soro sanguíneo e no FO em animais não-vacinados. No entanto, não houve correlação nos animais vacinados, porém houve alta correlação nas respostas da IgG em animais não-vacinados ($p < 0.0001$, $r = 0.839$) e vacinados ($p < 0.0001$, $r = 0.856$). A correlação entre a IgA no soro sanguíneo e FO foi fraca ($r \sim 0,3$) independentemente do status vacinal.

Recentemente, Mur et al. (2013) iniciaram os estudos sobre a presença de anticorpos contra o Vírus da Peste Suína Africana (ASFV) pelas técnicas de ELISA e imunoperoxidase (IP). O agente foi inoculado em oito animais e o FO foi estudado em diferentes momentos após a infecção. Os anticorpos contra ASFV foram encontrados nas amostras de FO de todos os animais desde a infecção precoce até o final do experimento. O estudo comprova a possibilidade da utilização do FO para o diagnóstico e monitoramento do ASFV.

Proteínas

Desde o início do século XX há estudos sobre a detecção das proteínas no fluido oral dos humanos objetivando compreender a composição salivar (FRANK SMITHIES, 1912). Em meados do século XX, Brandtzaeg (1965) comparou a quantidade de Igs, albumina e fibrinogênios presentes no FO e soro sanguíneo de humanos. Desde então, a ciência tem evoluído de tal forma que, atualmente, já é possível identificar proteínas indicadoras de doenças degenerativas como o câncer de boca, mama e pâncreas analisando somente os metabólitos presentes no FO humano (SUGIMOTO et al., 2010).

Ngounou Wetie et al. (2015) recentemente realizaram um estudo piloto cujo objetivo foi

identificar biomarcadores salivares da desordem de espectro autista (ASD) em humanos. O estudo encontrou diferença significativa entre proteínas salivares de indivíduos do grupo controle e com a ASD.

Na metade do século XX surgiram os primeiros estudos sobre a composição de proteínas na saliva dos suínos. Hudman et al. (1957) estudaram a presença da amilase na saliva de suínos jovens (um a 49 dias de idade). No entanto, somente a partir do ano de 2000 que os estudos foram aprofundados, principalmente, na detecção de proteínas indicadoras do status sanitário e bem-estar dos suínos.

A detecção das proteínas de fase aguda (PFA) pode ser utilizada para monitorar o estresse, processos inflamatórios e infecciosos no suíno (GUTIERREZ et al., 2009; BAPTISTA et al., 2011). A haptoglobina e a proteína c-reativa, ambas proteínas de fase aguda, foram quantificadas no FO de suínos cronicamente infectados pelo PRRSV. Os resultados revelaram aumento dessas proteínas nos animais acometidos e as análises estatísticas demonstraram que as amostras do FO foram mais eficientes para quantificar as PFA do que as do soro sanguíneo (GUTIERREZ et al., 2009). Em 2013, Gutierrez et al. determinaram o padrão circadiano das PFA presentes no fluido oral suíno.

Outra proteína recentemente estudada no FO suíno foi a amilóide sérica A (SAA), cuja concentração foi comparada no soro sanguíneo e no FO de suínos naturalmente infectados pelo PRRSV ($n=60$) e saudáveis ($n=50$). De acordo com os resultados, houve diferença significativa ($p < 0,0001$) entre os animais acometidos e saudáveis, tanto nas mensurações realizadas no soro sanguíneo, quanto nas concentrações no fluido oral. A dosagem da SSA no FO revelou-se como uma valiosa ferramenta para diferenciar suínos saudáveis dos acometidos por PRRSV (SOLER et al., 2012).

Gutierrez et al. (2011) publicaram um estudo sobre a análise proteômica da saliva proveniente de suínos doentes e clinicamente saudáveis. O estudo foi importante para estabelecer um padrão de referência nos valores de certas proteínas. Um total de 13 diferentes e específicas proteínas salivares foram identificadas, proporcionando a investigação e diagnóstico de doenças por meio de biomarcadores específicos.

Hormônios esteroides

O cortisol é um hormônio esteróide adrenal, que se caracteriza por pequenas moléculas com peso molecular de 250 a 350 Da, com estruturas químicas muito semelhantes e não espécie-específicas. Devido à sua solubilidade em lipídios, o cortisol pode ser facilmente detectado na saliva (KAUFMAN e LAMSTER, 2002; CASTRO e MOREIRA, 2003).

Independentemente do fluxo salivar, a taxa de difusão dos hormônios esteróides, particularmente, o cortisol, é geralmente elevada sendo o suficiente para manter uma relação constante entre os níveis salivares e séricos. O aumento no cortisol sérico reflete no cortisol salivar em menos de cinco minutos (VINNING et al., 1983; KAUFMAN e LAMSTER, 2002).

A dosagem do cortisol é uma das formas de se avaliar o bem-estar dos suínos e constitui uma ferramenta importante na mensuração do estresse. A dosagem sanguínea do cortisol é restrita, pois a captura e o manuseio podem causar estresse e interferir na avaliação precisa do hormônio. Desta forma, a utilização de um método não invasivo, tal como a colheita do FO, torna-se necessária para a correta avaliação dos níveis de cortisol (COOK et al., 2000; BAPTISTA et al., 2011).

Os primeiros estudos sobre a detecção do cortisol na saliva ocorreram na década de 60, sendo realizados em humanos com objetivos diversos, entre eles, a detecção dos hormônios esteróides relacionados com a Síndrome de Cushing (KATZ e SHANNON, 1964).

Na espécie suína, os primeiros estudos sobre o cortisol no FO surgiram na década de 80. Os trabalhos abordavam a correlação entre o cortisol salivar e o sérico, bem como a mensuração do estresse em diferentes situações, tais como o transporte, mistura dos animais e privação de água e alimento (PARROTT et al., 1989; PARROTT e MISSON, 1989).

Na literatura são utilizados diferentes ensaios para a mensuração do cortisol salivar. Os métodos diagnósticos mais comumente encontrados são o ELISA e o RIA. Observa-se que recentemente, a aplicação do ELISA tem sido utilizada com frequência na detecção do cortisol salivar em suínos (BAPTISTA, 2012; MARTÍN et al., 2013; NA-LAMPANG, 2013; O'DRISCOLL et al., 2013). No entanto, os RIAs são os mais comuns e foram os primeiros métodos empregados na área (PARROTT et al., 1989; BUSHONG et al., 2000; JAY et al., 2011). Os autores Escribano et al.

(2012) validaram o ensaio imunoenzimático quimioluminescente, demonstrando a versatilidade e variedade nas formas de mensuração do cortisol salivar na espécie suína.

Outro hormônio também mensurado no FO suíno é a progesterona, que em estudo desenvolvido por Moriyoshi et al. (1996) foi capaz de diagnosticar precocemente a gestação em fêmeas. Nos suínos machos pode-se detectar pelo FO o hormônio esteróide androsterona (16-androstene), responsável pelo odor sexual presente na carne de machos inteiros (BABOL et al., 1996).

A testosterona pode ser quantificada no FO e por meio da comparação com o seu padrão circadiano, utilizada como marcador do estresse agudo em suínos ($p < 0,01$), de acordo com estudo realizado por Escribano et al. (2014).

Considerações finais

O uso do FO como amostra clínica tem se tornado cada vez mais frequente. Nos suínos, a facilidade do procedimento de colheita aliada ao progressivo desenvolvimento dos métodos laboratoriais confere ao FO um substituto em potencial do sangue. Em contrapartida, é necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que ampliem os métodos laboratoriais e validem o FO como amostra clínica.

Referências

- AMADO, L.A. et al. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 149-155, 2006.
- BABOL, J.; SQUIRES, E.J.; BONNEAU, M. Factors regulating the concentrations of 16-androstene steroids in submaxillary salivary glands of pigs. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 413-419, 1996.
- BAPTISTA, R.I.A.A. **Avaliação comportamental e fisiológica de suínos em baias individuais e gaiolas metabólicas**. 2012. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- BAPTISTA, R.I.A.A.; BERTANI, G.R.; BARBOSA, C.N. Indicadores do bem-estar em suíno. **Ciência Rural**, v. 41, n. 10, p. 1823-1830, 2011.
- BARBOSA, C.N. et al. Aplicação da metodologia de coleta do fluido oral em suínos mestiços. **Medicina Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 32-38, 2013.
- BRANDTZAEG, P. Do salivary antibodies reliably

- reflect both mucosal and systemic immunity? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1098, p.288-311, 2007.
- BRANDTZAEG, P. Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket fluid, serum and saliva. **Archives of Oral Biology**, v. 10, n. 5, p. 795-802, 1965.
- BUSHONG, D.M.; FRIEND, T.H.; KNABE, D. A. Salivary and plasma cortisol response to adrenocorticotropin administration in pigs. **Laboratory Animals**, v. 34, p. 171-181, 2000.
- CASTRO, M.; MOREIRA, A.C. Análise crítica do cortisol salivar na avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 4, p. 458-367, 2003.
- CHALLACOMBE, S.J. et al. Passage of immunoglobulins from plasma to the oral cavity in rhesus monkeys. **Immunology**, v. 35, p. 923-931, 1978.
- COOK, C.J. et al. Hands-on and hands-off measurement of stress. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. Wallingford: CAB International, 2000. Cap.6, p.123-146.
- CORTHIER G. Swine fever: influence of passive immunity on pig immune response following vaccination with a live virus vaccine (Thiverval strain). **Annals of Veterinary Research**, v. 7, p. 361-372, 1976.
- COSTA, G.; OLIVEIRA, S.; TORRISON, J. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in oral-fluid samples obtained from experimentally infected pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 20, n. 2, p. 78-81, 2012.
- DALLA COSTA, O.A. et al. Tempo de jejum na granja sobre o perfil hormonal e os parâmetros fisiológicos em suínos de abate pesados. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2300-2306, 2008.
- DeBUYSSCHER, E.; BERMAN, D. Secretory immune response in intestinal mucosa and salivary gland after experimental infection of pigs with transmissible gastro-enteritis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 1214-1220, 1980.
- DeLIMA, A.J.; VAN DYKE, T.E. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. **Periodontology 2000**, v. 31, p. 55-76, 2003.
- DETMER, S.E. et al. Detection of influenza A virus in porcine oral fluid samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 241-247, 2011.
- EBLÉ, P.L. et al. Vaccination of pigs two weeks before infection significantly reduces transmission of foot-and-mouth disease virus. **Vaccine**, v. 22, p.1372-1378, 2004.
- ESCRIBANO, D.; FUENTES-RUBIO, M.; CERON, J.J. Salivary testosterone measurements in growing pigs: validation of an automated chemiluminescent immunoassay and its possible use as an acute stress marker. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 20-25, 2014.
- ESCRIBANO, D.; FUENTES-RUBIO, M.; CERÓN, J.J. Validation of an automated chemiluminescent immunoassay for salivary cortisol measurements in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 918-923, 2012.
- FRANK SMITHIES, M.D. The glycytryptophan (peptid) splitting agent in human saliva. **The Archives of Internal Medicine**, v. 10, n. 6, p. 521-533, 1912.
- GIMÉNEZ-LIROLA, L.G. et al. Improving ante mortem diagnosis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, p. 113-121, 2013.
- GRANDIN, T.; JOHNSON, C. **O bem-estar dos animais – Proposta de uma vida melhor para todos os bichos**. São Paulo: Rocco, 2010. 334 p.
- GROOPMAN, J.E. et al. HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. **Science**, v. 226, p. 447-449, 1984.
- GUTIÉRREZ, A.M. et al. Circadian pattern of acute phase proteins in the saliva growing pigs. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 2, p. 167-170, 2013.
- GUTIÉRREZ, A.M. et al. Proteomic analysis of porcine saliva. **The Veterinary Journal**, v. 187, p. 356-362, 2011.
- GUTIÉRREZ, A.M. et al. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 218-223, 2009.
- HELFAND, R.F. et al. Comparative detection of measles-specific IgM in oral fluid and serum from children by an antibody-capture IgM EIA. **The Journal of Infectious Diseases**, v.173, p.1470-1474, 1996.
- HENLE, G. et al. Isolation of mumps virus from human beings with induced apparent or inapparent

- infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 88, n. 2, p.223-232, 1948.
- HILLMANN, E. et al. Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, v. 2, p. 405-409, 2008.
- HODINKA, R.L.; NAGASHUNMUGAM, T.; MALAMUD, D. Detection of human immunodeficiency virus antibodies in oral fluids. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 4, p. 419-426, 1998.
- HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. **Imunologia para odontologia**. Porto Alegre: Artmed, 2007, 310 p.
- HOWE, P.R. A study of the microorganisms of dental caries. **The Journal of Medical Research**, v. 36, n. 3, p. 481-492, 1917.
- HUDMAN, D.B. et al. Digestive enzymes of the baby pig. Pancreatic and salivary amylase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 3, n. 9, p. 691-693, 1957.
- HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v.85, p.162-169, 2001.
- JAY, D.C. et al. Effect of prenatal stress on subsequent response to mixing stress and a lipopolysaccharide challenge in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1787-1794, 2011.
- KATZ, F.H.; SHANNON, I.L. Identification and significance of parotid fluid corticosteroids. **Acta Endocrinology**, v. 46, p. 393-404, 1964.
- KAUFMAN, E.; LAMSTER, I.B. The diagnostic applications of saliva – a review. **Oral Biology & Medicine**, v. 13, n. 2, p. 197-212, 2002.
- KITTAWORNAT, A. et al. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 2, p. 262-269, 2012.
- KITTAWORNAT, A. et al. Kinetics of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) humoral immune response in swine serum and oral fluids collected from individual boars. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 61, p. 1-10, 2013.
- MADAR, R.; STRAKA, S.; BASKA, T. Detection of antibodies in saliva - an effective auxiliary method in surveillance of infectious diseases. **Bratislavské Lekárske Listy**, v. 103, n. 1, p. 38-41, 2002.
- MARTÍN, P. et al. Cortisol en saliva como indicador de estrés en porcino. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 7, n. 1, p. 30-33, 2013.
- MCKIE, A.; VYSE, A.; MAPLE, C. Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 2, p. 18-24, 2002.
- MESTECKY, J. et al. **Mucosal Immunology**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2005. 2064 p.
- MORIYOSHI, M. et al. Early pregnancy diagnosis in the sow by saliva progesterone measurement using a bovine milk progesterone qualitative test EIA kit. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 58, n. 8, p. 737-741, 1996.
- MUR, L. et al. Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever. **Veterinary Microbiology**, v.165, p.135-139, 2013.
- NA-LAMPANG, P. Effects of methods of confinement during transportation of market pigs on their behavior, stress and injury. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 137-141, 2013.
- NGOUNOU WETIE, A.G. et al. A pilot proteomic of salivary biomarkers in autism spectrum disorder. **Autism Research**, v. 8, n. 3, p. 338-350, 2015.
- O'DRISCOLL, K. et al. The influence of a magnesium rich marine supplement on behaviour, salivary cortisol levels, and skin lesions in growing pigs exposed to acute stressors. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 145, n. 3-4, p. 92, 2013.
- PANYASING, Y. et al. Kinetics of influenza A virus nucleoprotein antibody (IgM, IgA, and IgG) in serum and oral fluid specimens from pigs infected under experimental conditions. **Vaccine**, v. 31, n. 52, p. 6210-6215, 2013.
- PARROTT, R.F.; MISSON, B.H. Changes in pig salivary cortisol in response to transport simulation, food and water deprivation, and mixing. **The British Veterinary Journal**, v. 145, n. 6, p. 501-505, 1989.
- PARROTT, R.F.; MISSON, B.H.; BALDWIN, B.A. Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. **The British Veterinary Journal**, v. 145, n. 4. p. 362-366, 1989.
- PRICKETT, J.R. et al. Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for

- porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. **Journal of Swine Health and Production**, v. 1, p. 86-91, 2008.
- PRICKETT, J.R. et al. Prolonged detection of PCV2 and anti-PCV2 antibody in oral fluids following experimental inoculation. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 58, n. 2, p. 121-127, 2011.
- PRICKETT, J.R.; ZIMMERMAN, J.J. The development of oral fluid-based diagnostics and application in veterinary medicine. **Animal Health Research Reviews**, v. 11, n. 2, p. 207-216, 2010.
- ROUX, M.N.; NOCARD. At what moment does the virus of rabies appear in the saliva of rabid animals? **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**. v. 3, p. 128-134, 1890.
- SABIN, A.B.; WARD, R. The natural history of human poliomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 74, n. 6, p. 519-529, 1941.
- SHAFIQ, N.; MALHOTRA, S. Use of antibiotics in community-acquired pneumonia. In: JINDAL, S. K.; GULERIA, R. **World clinics pulmonary & critical care medicine: Pneumonias**. Jaypee: Daryaganj, 2012. p. 95-116.
- SHILITOE, E.J.; LENHER, T. Immunoglobulins and complement in crevicular fluid, serum and saliva in man. **Archives of Oral Biology**, v. 17, n. 2, p. 241-247, 1972.
- SISSON, S.; GROSSMAN, J.D.; GETTY, R. **Anatomy of the Domestic Animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 1975, 2130p.
- SOLER, L.; GUTIÉRREZ, A.; CERÓN, J.J. Serum amyloid A measurements in saliva and serum in growing pigs affected by porcine respiratory and reproductive syndrome in field conditions. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p.1266-1270, 2012.
- STALLKNECHT, D.E. et al. Potential for contact and mechanical vector transmission of vesicular stomatitis virus New Jersey in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 43-48, 1999.
- SUGIMOTO, M. et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. **Metabolomics**, v. 6, p. 78-95, 2010.
- VINNING, R.F. et al. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 329-335, 1983.
- WARRENER, L.; SAMUEL, D. Evaluation of a commercial assay for the detection of mumps specific IgM antibodies in oral fluid and serum specimens. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, p.130-134, 2006.