

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento Medicina y Cirugía Animal

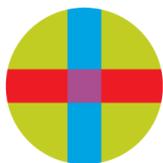


ESTUDIO de MARCADORES de DAÑO
MUSCULAR en SALIVA HUMANA y de PERRO: un
CASO de *ONE HEALTH*

TESIS DOCTORAL

Tomás Barranco Benacloch

VALENCIA
2017



CEU

*Universidad
Cardenal Herrera*

Facultad de Veterinaria

MÓNICA RUBIO ZARAGOZA¹, ASTA TVARIJONAVICIUTE ² Y JOSÉ JOAQUÍN CERÓN MADRIGAL², DOCTORES EN VETERINARIA Y PROFESORES DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD CEU CARDENAL HERRERA¹ Y DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA².

INFORMAN

Que la Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO DE MARCADORES DE DAÑO MUSCULAR EN SALIVA HUMANA Y DE PERRO: UN CASO DE ONE HEALTH”** de la que es autor **Don Tomás Barranco Benacloch**, Licenciado en Ciencias Veterinarias, ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Medicina y Cirugía Animal en el marco del Programa de Doctorado de Ciencias Veterinarias, y reúne las condiciones científicas y formales para ser presentada ante el tribunal correspondiente a fin de obtener el Grado de Doctor.

Y para que conste, firmamos el presente en Alfara del Patriarca (Valencia), a _____ de _____ de 2017.

Fdo: Mónica Rubio Zaragoza Asta Tvarijonaviciute José J. Cerón Madrigal

Agradecimientos

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Agradecimientos

A la luz de las llamas, en mi casa, con el pensamiento puesto en el inminente final de este trabajo y con la reflexión de a quién y cómo agradecerse.

Siempre he creído que todos (y me incluyo) somos el resultado de una compleja serie de interacciones e interrelaciones con el resto. Influenciamos y nos influyen: como somos, que elegimos, en qué creemos, como nos comportamos...

Es por ello que considero este trabajo el resultado de mis interacciones con todos los seres que han pasado por mi vida, haya sido de forma larga o fugaz. En definitiva, a todos, estén o se hayan ido ya: muchas gracias.

No obstante y en especial debo agradecerse a mi familia, y más concretamente:

A mis padres, Isabel y Tomás, por ser mis padres, todo. Mamá y Papá, gracias por enseñarme a pensar por mí mismo, a ser crítico, a amar y respetar a todos los seres vivos, a interesarme por la cultura en todos sus ámbitos y a infinidad de cosas más.

A mis abuelos, por un lado María y Tomás, y por otro Catalina y Pepe. Y en especial a mi abuelo Pepe, porque siempre estás ahí, sea para arreglar una luz, transportar vigas o levantar una casa.

A Blue. Se te echa mucho de menos, cada vez que vamos al campo mi madre se acerca a verte, a hablarte... (sabes que yo no creo mucho en esas cosas) pero me emociona. Muchas gracias Blue.

A mis amigos, cuento con la grandísima suerte de tener muchos y buenos. Mi padre siempre me decía “quien tiene un amigo tiene un tesoro” y tiene razón. A los veterinarios y en especial: Tomás Lozano, Alfredo Llopis, Andrés Quiñonero, Amparo Andújar, Ignacio Quiñonero, Víctor Almagro, Jesús Gil, Esther Medina, Bea Belda, Juan José Camarasa, Inés Pallarés, Antonio Gijón, Juan Conesa, José Zapata, Ana Celda y David Gómez. A los amigos del pub (con cariño): Carlos Collado, Eduardo Pérez, Patricia Puga, Susana García, Jéscica Rodríguez, Alba Calabuig (y a su proyecto Julieta Velvet por su apoyo en la edición de imágenes), Ana Vidal, Esther Puga, Carolina Molina, Jesús Pérez, Enrique Micó, Pepe Fuster, Ricardo Arce y a mi socio José Luis Barber con el que comparto mi primera hipoteca. A los de la oposición: Alba Fernández, Silvia Milvaques, Almudena y María Valiente. Y por supuesto a Robert Grau, Nélica Barreiro y a Juan Manuel Mora, por estar siempre.

Aunque nos distanciamos, se separen nuestros caminos, me habéis ganado como amigo, aunque hablemos o nos veamos poco, siempre seremos amigos. Me alegraré de vuestros logros y os ayudaré a levantarlos si tropezáis. Gracias.

Tomás Lozano (Vomer). Has influenciado mucho en mí (hasta me he comprado un violín...y me queda muy poco para montarme una fábrica de madalenas), eres para mí un referente en muchas cosas y, además, eres mi ángel de la ética y de la razón en esos momentos de juicio nublado. Gracias.

A mis tutores del master de la Universidad Complutense de Madrid, el Dr. Luis Olivos, la Dra. María Victoria Barahona y el Dr. Antonio Artalejo. Por su paciencia y por enseñarme su mundo.

A mis tutores de esta tesis doctoral. A la Dra. Mónica Rubio porque siempre que me ve se desvive por ayudarme en todo lo que pueda, tenga o no que ver con este trabajo. A la Dra. Asta Tvarijonavičute, por su ayuda y ánimos en cada correo electrónico, me encanta tu positividad y tu entusiasmo, es contagioso.

Al Dr. José Joaquín Cerón, además de tutor de este trabajo, eres sin duda el profesor de la carrera que más ha influido en mí. Recuerdo dos cosas que me han marcado mucho. La primera de ellas tus clases: transparencias en pleno siglo XXI y dibujos hechos a mano no muy bonitos pero, sin embargo, conectabas de una forma singular, aún las recuerdo: patología general. A ello, he de sumar una conversación contigo que reconfiguró mi método de estudio desde ese momento en adelante. Había sacado una de mis primeras buenas notas en la carrera, me preguntaste como había estudiado tu asignatura y te contesté que haciendo síntesis de todo, a partir de ese momento mis notas viraron positivamente. Muchas gracias Cerón por ser mi casero, mi profesor, mi tutor y mi amigo.

Aunque hayamos tomado caminos diferentes, me arrepentiría de no plasmar estas líneas, para aquellas personas que en algún momento compartieron camino conmigo y en especial a Alicia Nohalez, que me ayudó, también, a virar positivamente en mis estudios, a Priscila Minguet por compartir mis inicios en la investigación y a Sara Rivero por decirme tantas veces “ponte con el doctorado”, también gracias.

También expresar mi agradecimiento a la Universidad Cardenal Herrera-CEU, a la Universidad de Murcia, a sus respectivas facultades de veterinaria y a todo el personal que ha hecho posible este trabajo.

Al grupo de investigación del Interlab-UMU por el excelente desempeño de su vocación, y en concreto a todo el personal que me ayudó dándome algo de su tiempo.

A la Sociedad Valenciana de Protección de Animales y Plantas por su colaboración.

Y finalmente, a la Fundación García Cugat por la confianza depositada y, por la financiación de proyectos que forman parte de esta tesis.

Todas estas personas y más, están en mí, están en este trabajo, estén o no acompañándome ya en mi vida. Por ello mi más humilde agradecimiento.

A mi tierra

A los que están

Y a los que ya no



Índices

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Índice de Contenido

| | |
|----------------------------|-----|
| Agradecimientos..... | III |
| Índices | VI |
| Índice de contenido | VII |
| Índice de tablas | X |
| Índice de figuras..... | XII |
| Listado abreviaturas | XIV |
| Introducción..... | 1 |
| Hipótesis y objetivos..... | 5 |
| Hipótesis de trabajo..... | 5 |

| | |
|---|----|
| Objetivos..... | 7 |
| Revisión bibliográfica..... | 8 |
| La saliva | 9 |
| Definición..... | 9 |
| Producción y secreción..... | 9 |
| Características y composición | 12 |
| La saliva como medio diagnóstico en general..... | 14 |
| Conceptos generales de CK, AST y LDH..... | 17 |
| Creatina quinasa (CK) | 17 |
| Aspartato aminotransferasa (AST) | 19 |
| Lactato deshidrogenasa (LDH)..... | 20 |
| Estudios de CK, AST y LDH en saliva en diferentes procesos patológicos | 23 |
| Estudios de almacenamiento y conservación de la saliva como muestra biológica..... | 26 |
| Material y métodos..... | 28 |
| Materiales y métodos comunes | 30 |
| Efecto de diferentes métodos de colección de saliva y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH | 33 |
| Efecto de diferentes tipos de almacenamiento sobre CK, AST y LDH..... | 36 |
| Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en perro..... | 39 |
| Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en humanos | 42 |
| Resultados..... | 46 |
| Efecto de diferentes métodos de colección de saliva y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH | 48 |
| Efecto de diferentes tipos de almacenamiento sobre CK, LDH y AST..... | 50 |
| Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en perro..... | 54 |
| Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en humanos | 56 |
| Discusión | 58 |

| | |
|--|----|
| Efecto de diferentes métodos de colección de saliva y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH | 60 |
| Efecto de diferentes tipos de almacenamiento sobre CK, AST y LDH..... | 61 |
| Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en perro..... | 63 |
| Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en humanos..... | 65 |
| Conclusiones | 68 |
| Resumen..... | 71 |
| Summary | 74 |
| Bibliografía..... | 77 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Secreción diaria de jugos digestivos del humano y del perro..... | 10 |
| Tabla 2. Comparación de las glándulas salivales menores y mayores en el perro y en el humano | 12 |
| Tabla 3. Sustancias y agentes detectados en saliva..... | 16 |
| Tabla 4. División métodos de colección de muestras..... | 34 |
| Tabla 5. División métodos de centrifugación de muestras para su posterior análisis..... | 34 |
| Tabla 6. Grupo ciclos de congelación-descongelación..... | 37 |
| Tabla 7. Grupos para evaluación de los diferentes tipos de almacenamiento | 37 |
| Tabla 8. Tiempo de análisis de las muestras | 37 |
| Tabla 9. Grupos para evaluación de los diferentes tipos de almacenamiento | 40 |

| | |
|--|----|
| Tabla 10. Tiempos de obtención de muestras..... | 43 |
| Tabla 11. Mediana y rango de CK, AST y LDH bajo diferentes métodos de procesado | 49 |
| Tabla 12. Mediana y rango de los niveles enzimáticos (CK y AST) bajo diferentes condiciones de centrifugación | 49 |
| Tabla 13. Coeficientes de correlación de Spearman entre los valores enzimáticos de las muestras de los diferentes métodos de procesado | 49 |
| Tabla 14. Mediana y rango de CK (UI/L) bajo las diferentes condiciones de almacenamiento del estudio | 51 |
| Tabla 15. Mediana y rango de AST (UI/L) bajo las diferentes condiciones de almacenamiento del estudio | 52 |
| Tabla 16. Mediana y rango de LDH (UI/L) bajo las diferentes condiciones de almacenamiento del estudio | 53 |
| Tabla 17. Mediana y rango de CK (UI/L) en saliva y suero..... | 55 |
| Tabla 18. Mediana y rango de AST (UI/L) en saliva y suero..... | 55 |
| Tabla 19. Mediana y rango de CK (IU/L) en suero, saliva sin corrección y con corrección en base al flujo..... | 57 |
| Tabla 20. Mediana y rango de AST (IU/L) en suero, saliva sin corrección y con corrección en base al flujo..... | 57 |
| Tabla 21. Mediana y rango de LDH (IU/L) en suero, saliva sin corrección y con corrección en base al flujo..... | 57 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación esquemática de la topografía de las glándulas salivales del perro | 12 |
| Figura 2. Esquema que muestra la situación de las glándulas salivales mayores..... | 12 |
| Figura 3. Función biológica de la creatina kinasa..... | 18 |
| Figura 4. Función biológica de la AST..... | 20 |
| Figura 5. Función biológica de LDH. | 21 |
| Figura 6. Esquema del protocolo de obtención de alícuotas para el estudio del efecto de los ciclos de congelación-descongelación (1) y de las condiciones de almacenamiento (2) | 36 |

| | |
|---|----|
| Figura 7. Estabilidad de CK (media y desviación estándar) en el tiempo ante diferentes tipos de almacenamiento | 51 |
| Figura 8. Estabilidad de AST (media y desviación estándar) en el tiempo ante diferentes tipos de almacenamiento | 52 |
| Figura 9. Estabilidad de LDH (media y desviación estándar) en el tiempo ante diferentes tipos de almacenamiento | 53 |
| Figura 10. Gráficas de los valores de CK en saliva y suero de perro | 55 |
| Figura 11. Gráficas de los valores de AST en saliva y suero..... | 55 |

Listado Abreviaturas

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Listado de abreviaturas

A continuación se detallan todas las abreviaturas que aparecen a lo largo del documento:

- ADP. Adenosin difosfato.
- ALT. Alanina aminotransferasa.
- AST. Aspartato aminotransferasa.
- ATP. Trifosfato de adenosina.
- CgA. Cromogranina A.
- CK. Creatina quinasa.
- CK-BB. Isoforma (cerebral) de creatina quinasa.
- CK-MB. Isoforma (cardíaca) de creatina quinasa.

- CK-MM. Isoforma (muscular) de creatina quinasa.
- CRP. Proteína C reactiva.
- DHEA. Dehidroepiandrosterona.
- EC. Código enzimático.
- EGF. Factor de crecimiento epidérmico.
- IFCC. Federación Internacional de Química Clínica y Medicina Laboratorial.
- IGF. Factor de crecimiento insulínico.
- kDa. Kilodalton.
- LDH. Lactato deshidrogenasa.
- NAD. Dinucleótido de nicotinamida y adenina.
- NGF. Factor de crecimiento nervioso.
- NT-ProBNP. Propéptido natriurético cerebral N-terminal.
- RPE. Índice de esfuerzo percibido (*Rating of Perceived Exertion*).
- SVPAP. Sociedad Valenciana de Protección de Animales y Plantas.
- TNF. Factor de necrosis tumoral.
- VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular.
- VIH. Virus de la inmunodeficiencia humana.

Introducción

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Introducción

La saliva es un fluido biológico secretado en cantidades relativamente altas y de forma prácticamente regular. En los últimos años, está creciendo el interés en su estudio como muestra de utilidad clínica, ya que contiene elementos que pueden ser de uso diagnóstico, algunos de ellos comunes con sangre y orina (Lac 2001).

Además, presenta muchos beneficios, como por ejemplo que su obtención sea segura, no invasiva, a la vez que económica y simple y que no cause estrés o incomodidad al paciente (Lawrence 2002; Mirzaii-Dizgah *et al.* 2011).

Por otra parte, desde el punto de vista analítico, no se ve afectada por la hemólisis como puede ocurrir con el suero. Además, contiene menos proteínas, lo que se traduce en un menor riesgo de interferencias (Mirzaii-Dizgah *et al.* 2011).

No obstante, a la hora de usar la saliva como fluido diagnóstico hay que tener en cuenta que existen diferentes factores que pueden influir en la concentración de sus analitos. Como por ejemplo el flujo salival (ml/min), el ritmo circadiano, el ejercicio, fumar, la ingesta de alimentos antes de la colección de saliva y/o enfermedades odontológicas (Dawes 1993; Gutiérrez *et al.* 2013).

Centrándonos en el daño muscular, hay enzimas como la creatina quinasa (CK, EC 2.7.3.2), la aspartato aminotransferasa (AST, EC 2.6.1.1), la alanina aminotransferasa (ALT, EC 2.6.1.2) y la lactato deshidrogenasa (LDH, EC 1.1.1.27) que aumentan en suero debido a un daño en el tejido y/o necrosis celular agudo o crónico (Mokuno *et al.* 1987; Szumilak *et al.* 1998). Aunque también, se pueden dar cambios en los niveles enzimáticos relacionados con el tejido muscular en sujetos normales o atletas tras un ejercicio extenuante (Priest *et al.* 1982; Wolf *et al.* 1987; Ide *et al.* 1999). Estas enzimas se encuentran en el citoplasma de células musculares y, por tanto, pueden detectarse en suero o plasma tras la rotura celular (Brancaccio *et al.* 2008).

El concepto *One Health* ha sido definido como el esfuerzo colaborativo multidisciplinario, a nivel local, nacional y global, en aras de alcanzar una salud óptima para las personas y los animales (American Veterinary Medical Association, 2008). De entre sus diferentes objetivos cabe destacar la importancia de la investigación clínica translacional, fomentando que los estudios se realicen de forma simultánea y comparada en humana y en diferentes especies animales.

En aplicación del mencionado concepto, la presente tesis doctoral ha conllevado la realización de un estudio comparativo de los marcadores de daño muscular en saliva de perro y humana. De forma adicional, se usará la saliva humana como modelo para estudiar el efecto del procesado y de diferentes condiciones de almacenamiento de las muestras sobre los enzimas, dado que pueden obtenerse mayores cantidades de muestra que en el perro permitiéndonos evaluar de mejor forma las condiciones óptimas de procesamiento y almacenamiento que pueden llevarse a cabo en saliva.

Hipótesis y Objetivos

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Hipótesis de Trabajo

El daño muscular es un fenómeno difícil de medir *in vivo* ya que requiere la obtención de biopsias musculares. La rotura muscular consiste en la rotura de fibras musculares, lo que provoca la liberación de las sustancias que se encuentran dentro de las células musculares al torrente sanguíneo (Brancaccio *et al.* 2008). Fisiopatológicamente, una de las formas de rotura celular más descrita se produce por una disminución del trifosfato de adenosina (ATP) intracelular, lo que conlleva un descenso en la actividad de las bombas Na/K ATPasa y Na/Ca ATPasa. Esto produce, un aumento de sodio y calcio intracelular que deriva en un edema intracelular y en el incremento de la actividad de lipasas y proteasas originándose radicales libres y, finalmente, la rotura del sarcolema o membrana citoplasmática de las fibras musculares y liberación de las sustancias contenidas como las enzimas CK, AST y LDH

(Daher *et al.* 2005; Bosch *et al.* 2009). Es por ello que actualmente la medición del daño muscular se basa en la evaluación indirecta, a través del suero, de estas enzimas (Brancaccio *et al.* 2008).

El uso de la saliva ha avanzado mucho como medio diagnóstico en los últimos años, aunque no en el ámbito de las lesiones musculares. Existe además cierto desconocimiento sobre cuáles son los métodos de colección y procesado idóneos, así como cuál es el mejor método de almacenamiento que otorgue una buena relación estabilidad y durabilidad.

Ante esto, nuestra hipótesis de trabajo es que la saliva puede usarse como medio diagnóstico del daño muscular en perro y humana, evaluando las enzimas CK, AST y LDH, evitando el estrés o la incomodidad que provocan otros medios diagnósticos.

Objetivos

Basándonos en la hipótesis de trabajo, nos planteamos los siguientes objetivos para esta tesis doctoral:

- Estudiar el impacto de diferentes métodos de colección de saliva de humana y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH.
- Estudiar el impacto de los diferentes métodos de almacenamiento de la saliva de humana sobre marcadores CK, AST y LDH.
- Estudiar si la saliva podría ser utilizada como alternativa al suero para evaluar el daño muscular en el perro.
- Estudiar si la saliva puede ser utilizada como alternativa al suero para evaluar el daño muscular en el ser humano.

Revisión Bibliográfica

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

La saliva

Definición

La saliva es una secreción exocrina mucoserosa, clara, y ligeramente acídica. Es una mezcla de fluidos provenientes de las glándulas salivales, mayores y menores, junto al fluido crevicular gingival (Edgar 1992), compuesta por más de un 99% de agua (Humphrey and Williamson 2001).

Producción y secreción

En cualquier especie, se puede distinguir entre la salivación estimulada (ya sea por factores intrínsecos o extrínsecos) y la salivación no estimulada. Además, existe una

gran variabilidad individual en la producción de saliva (Humphrey and Williamson 2001).

Así, se estima que el ser humano saliva de forma no estimulada, aproximadamente, 0.1 ml/min. Sin embargo, bajo estimulación el valor mínimo de salivación estaría en torno a 0.2 ml/min (Edgar 1990). Como muestra la tabla 1, la secreción diaria normal de saliva en humanos oscila entre 800 y 1500 mililitros, con un promedio de 1000 mililitros (Humphrey and Williamson 2001). Mientras que en el caso del perro, el volumen diario de salivación sería aproximadamente de 300 ml para un perro de 20 Kg (Reece 2015).

Tabla 1. Secreción diaria de jugos digestivos del humano y del perro.

| | Volumen diario (ml) | |
|-----------------------|---------------------|--------------------|
| | Humano ^a | Perro ^b |
| Saliva | 1000 | 300 |
| Secreción gástrica | 1500 | 600 |
| Secreción pancreática | 1000 | 600 |
| Bilis | 1000 | 300 |
| Intestino delgado | 1800 | 600 |
| Glándulas de Brunner | 200 | - |
| Intestino grueso | 200 | 50 |
| TOTAL | 6700 | 3050 |
| % Saliva | 15.92 % | 9.83 % |

Datos adaptados de (Hall and Guyton 2011)^a, considerando un perro de 20 Kg (Reece 2015)^b

Sin embargo, estos datos sialométricos pueden verse afectados por diversas causas, desde el ciclo circadiano, disminuyendo la salivación por la noche (Dawes 1974; Gutiérrez *et al.* 2013) y el circanual, disminuyendo en épocas estivales (Edgar 1990), el sexo (Lukacs and Largaespada 2006), la edad (Denny *et al.* 1991; Fernández-Tresguerres Hernández *et al.* 2010). También puede influir la presencia de algún tipo de

enfermedad que determine una mayor -sialorrea- (Farber *et al.* 2015) o menor -hiposalivación o hiposialia- secreción (Mese and Matsuo 2007; Wang *et al.* 2016).

La saliva total está constituida por las secreciones de las glándulas, mayores y menores, así como por residuos, microorganismos y líquido o fluido crevicular. La saliva se forma a nivel de los acinos por transporte activo de electrólitos y arrastre pasivo de agua a partir de la sangre, así como por la síntesis de proteínas, enzimas y demás componentes. La composición de la saliva se modifica a lo largo de los conductos excretores, dando lugar a una saliva hipotónica respecto al plasma (Fernández-Tresguerres Hernández *et al.* 2010).

Se han identificado canales específicos para el agua o acuoporinas, que permiten el transporte específico de agua desde la sangre más rápido que la difusión pasiva, destacando “acuoporina 5” que juega un papel importante en la secreción fluida de las glándulas salivales (Delporte and Steinfeld 2006; Fernández-Tresguerres Hernández *et al.* 2010).

Glándulas salivales

En general, las glándulas salivales mayores (parótida, mandibular y sublingual) son las que secretan la mayor parte de la saliva y también la mayor parte de electrolitos, mientras que las glándulas menores (labiales, bucales, palatinas y linguales) contribuyen con una menor cantidad pero rica en sustancias presentes en la sangre (Edgar 1990).

Las principales glándulas salivales son las parótidas, las submandibulares y las sublinguales; además de muchas glándulas bucales pequeñas. Las glándulas parótidas secretan casi exclusivamente una saliva serosa rica en ptialina (una α -amilasa), destinada a digerir los almidones; por otro lado, las glándulas bucales secretan una saliva mucosa, con abundante mucina, que cumple las funciones de protección y lubricación; y por último las submandibulares y sublinguales secretan ambos tipos (Hall and Guyton 2011; Klein 2014).

Como puede verse en la Tabla 2 y en las Figuras 1 y 2, la distribución de las glándulas salivares entre el perro y el hombre es diferente.

| Tabla 2. Comparación de las glándulas salivales menores y mayores en el perro y en el humano. | | |
|---|---|---|
| Gl. Salivales | Perro ^a (Figura 1) | Humano ^b (Figura 2) |
| Menores | Labiales Carrillos (Cigomática) Linguales Palatinas Suelo cavidad bucal | Labiales Bucales Palatinas Linguales |
| Mayores | Parótida Mandibular (+++) Sublingual (mono y polistomática) | Parótida (+++) Submandibular Sublingual |

Los símbolos (+++) indican el mayor tamaño en comparación con las de su grupo. Adaptado de (König and Liebich 2005)^a y (Velayos 2012)^b

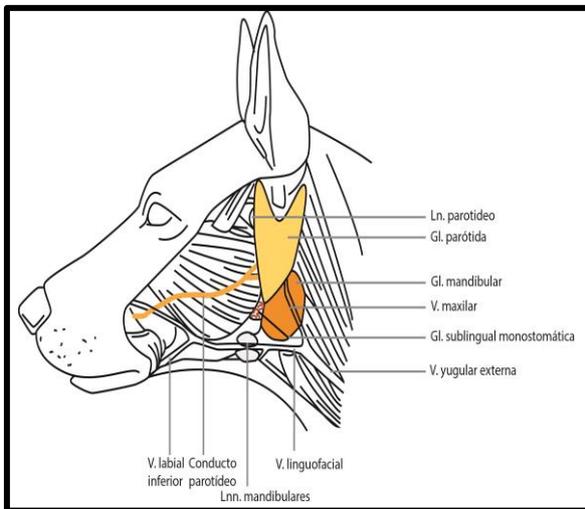


Figura 1. Representación esquemática de la topografía de las glándulas salivales del perro. Adaptado de (König and Liebich 2005).

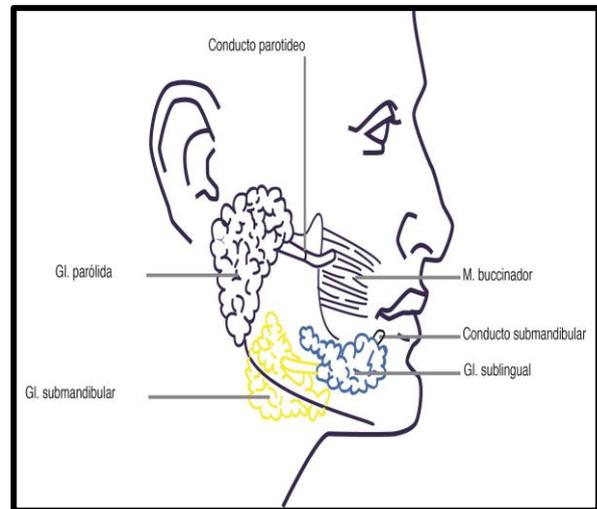


Figura 2. Representación esquemática de las glándulas salivales mayores en humana. Adaptado de (Velayos 2012).

Características y composición

La saliva está compuesta por agua en un 99%, el 1% restante corresponde a otros compuestos como electrolitos (sodio, potasio, calcio, magnesio, bicarbonato y fosfatos), inmunoglobulinas, proteínas, enzimas, mucinas y productos nitrogenados

como urea y amoníaco, entre otras sustancias (Humphrey and Williamson 2001; Yoshizawa *et al.* 2013).

Las proteínas más importantes son α -amilasa o ptialina, mucina, sialoproteínas, lipasa, lisozima, albúmina, lactoferrina, fibronectina y gammaglobulinas (IgA, IgG e IgM). Además, pueden excretarse a través de la saliva moléculas orgánicas como la glucosa, urea, lípidos, vitaminas (B₆, B₁₂), hormonas (estrógenos, cortisol) y factores de crecimiento. La fracción inorgánica la constituyen los iones sodio, potasio, calcio, cloro, fosfato, magnesio, hierro, zinc, cobre, bicarbonato y yodo (Fernández-Tresguerres Hernández *et al.* 2010).

El pH normal de la saliva está en torno a 6-7. Es decir, ligeramente ácida. Aunque el pH puede variar por el flujo de secreción, siendo más bajo (desde 5.3) en tasas bajas de salivación, y a la inversa (hasta 7.8) cuando la salivación es máxima (Edgar 1990; Yoshizawa *et al.* 2013). Por último, su densidad se encuentra entre 1002 a 1012 mg/L (Fernández-Tresguerres Hernández *et al.* 2010).

La saliva como medio diagnóstico en general

Históricamente, las enfermedades se diagnosticaban en base a los síntomas, el examen y la historia clínica y los análisis de suero y/u orina (Malamud and Rodriguez-Chavez 2011).

Actualmente, son muchas las áreas de investigación que se están desarrollando sobre los componentes salivales y las funciones de los mismos, tanto en el ámbito diagnóstico, como en el terapéutico y el preventivo, a nivel local y sistémico. (Humphrey and Williamson 2001).

La saliva presenta varias ventajas respecto a la sangre como medio diagnóstico. Entre las que podemos citar las siguientes:

- La obtención de las muestras es sencilla, y puede ser realizada por cualquier persona, mientras que las muestras sanguíneas han de obtenerse por personal especializado.
- El procedimiento de obtención es no invasivo y no doloroso.
- El procedimiento facilita la obtención de muestras repetidas a un mismo sujeto, pudiéndose realizar mejores seguimientos.
- Las muestras son más seguras para el manipulador, ejemplo de ello es que la saliva inhibe la infectividad del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).
- El procedimiento es más económico que la obtención de sangre, lo que puede reducir costes para el paciente y/o para el sistema sanitario.

Así, la saliva puede utilizarse para analizar los niveles o concentraciones de diversas sustancias fisiológicas y/o terapéuticas.

También puede usarse para detectar agentes patógenos como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (White *et al.* 2009; Parisi *et al.* 2009) y monitorizar el estado emocional, el hormonal, el inmunológico y/o el neurológico (Mandel 1993; Yoshizawa *et al.* 2013).

Los principales compuestos que se han detectado hasta ahora en saliva aparecen en la Tabla 3 junto a las referencias bibliográficas de los estudios en los que fueron detectadas. Algunas de las sustancias pueden relacionarse con enfermedades sistémicas, con mayor o menor especificidad, constituyéndose como marcadores de dichas enfermedades.

Tabla 3. Sustancias y agentes detectados en saliva.

| Tabla 3. Sustancias y agentes detectados en saliva. | | |
|---|--|--|
| | Marcadores | Referencias |
| Hormonas | Esteroides, testosterona, estriol, estrógeno, progesterona, aldosterona | (Christodoulides <i>et al.</i> 2007; Dias Fernandes <i>et al.</i> 2009; Parisi <i>et al.</i> 2009; Gavrilova and Lindau 2009; Touitou <i>et al.</i> 2009; Hamilton <i>et al.</i> 2009; Manolopoulou <i>et al.</i> 2010; Gray <i>et al.</i> 2010) |
| Anticuerpos | IgG, IgA, IgM | (Brandtzaeg 2007; Parisi <i>et al.</i> 2009; Warrenner <i>et al.</i> 2010) |
| Factores de crecimiento | Factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico (IGF) | (Taichman <i>et al.</i> 1998; Nam <i>et al.</i> 2007; Eckley <i>et al.</i> 2007; Adışen <i>et al.</i> 2008; Upile <i>et al.</i> 2009) |
| Citoquinas y quimioquinas | IL-1 beta, IL-8, IL-6, MCP-1, CX3CL1, GRO-1 alfa, troponina 1, factor de necrosis tumoral (TNF). | (Blicharz <i>et al.</i> 2008; Teles <i>et al.</i> 2009; Thomas <i>et al.</i> 2009; Suh <i>et al.</i> 2009; Roescher <i>et al.</i> 2009) |
| Fármacos y otras sustancias químicas | Etanol, anticonvulsiantes, antineoplásicas, analgésicas, antipiréticas, antibióticos, broncodilatadores, cotinina. | (Aps and Martens 2005; Drummer 2006; Langman 2007; Langel <i>et al.</i> 2008; Bosker and Huestis 2009) |
| Agentes infecciosos | Herpesvirus, virus de la hepatitis, VIH, papilomavirus, influenza, poliovirus, <i>E. coli</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>H. pylori</i> , <i>Treponema pallidum</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> | (Malamud and Rodriguez-Chavez 2011). |

Conceptos generales de CK, AST y LDH

Creatina quinasa (CK)

La CK es una enzima dimérica compuesta por dos tipos de subunidades monoméricas, M (muscular) y B (cerebral), con una masa molecular de 43 kDA. La CK cataliza la producción de fosfocreatina a través de la fosforilación de una molécula de creatina, consumiendo una molécula de ATP en el proceso, la reacción será a la inversa en caso de que se incremente concentración de ADP (Figura 3), es decir, regula las concentraciones. Existen 5 isoformas de CK, por un lado 3 isoformas citoplasmáticas (CK-MM, CK-BM, CK-BB), y por otro lado dos isoenzimas (sarcomérica y no sarcomérica) mitocondriales (Takagi *et al.* 2001).

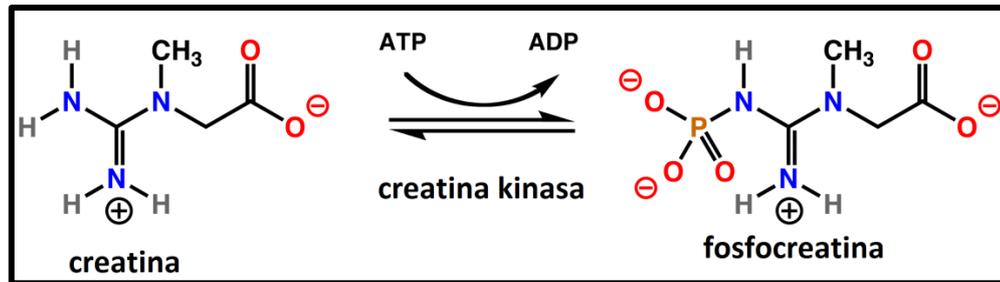


Figura 3. Función biológica de la creatina kinasa. Imagen adaptada de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Creatine_kinase_rxn.png

Las diferentes isoenzimas, debido a su distribución en los diferentes tejidos, se consideran marcadores del estado del mismo. Por ejemplo, la CK-MB aumenta con el infarto de miocardio, pues el 40% de los niveles de CK del miocardio lo constituyen dicha isoforma (Borrayo-Sánchez *et al.* 2006). CK-BB aumenta en episodios de daño cerebral (Pfeiffer *et al.* 1983). Y por último, la isoforma predominante, la CK-MM, se encuentra principalmente en los músculos y se erige como el principal marcador de daño muscular (Nigro *et al.* 1983).

En sujetos sanos, los niveles de CK total en suero provienen principalmente del músculo esquelético, y dependen de la edad, el sexo, la raza, la masa muscular y el estilo de vida, entre otros factores (Strømme *et al.* 2004). En condiciones patológicas, la monitorización de CK y la caracterización de sus isoenzimas en suero, se utiliza para el diagnóstico de miopatías, cardiomiopatías y encefalopatías (Kloss *et al.* 1985; Hoffman and Clemens 1996; Hina *et al.* 1997). Por ello CK, y especialmente CK-MB, es un buen marcador de necrosis miocárdica, con gran sensibilidad en la detección y pronóstico del infarto (Rajappa and Sharma 2005; Galla *et al.* 2006). Por otro lado, se pueden observar incrementos en las concentraciones de CK-BB en sujetos que han padecido lesiones cerebrovasculares agudas (Bell *et al.* 1978) o esclerosis amiotrófica lateral (Iłzecka and Stelmasiak 2003).

Los trastornos músculo esqueléticos se manifiestan con dolor, fatiga, debilidad y con un aumento de CK en suero (Brancaccio *et al.* 2008). No obstante, aunque en las miopatías los niveles de CK en suero aumentan, estos niveles son diferentes según la enfermedad y el estado de la misma. Por ejemplo, en la distrofia muscular se dan

niveles muy altos de CK, niveles que en las últimas etapas de la enfermedad descienden debido a los cambios que operan en el tejido muscular (Zatz *et al.* 1991; El-Bohy and Wong 2005). Otras patologías musculares como la deficiencia de selenio o la miopatía nemalínica suelen presentar únicamente un ligero aumento de los niveles de CK en suero (Chariot and Bignani 2003; Chahin *et al.* 2005). Otras causas de aumento de CK en suero pueden ser las inyecciones intramusculares, donde la magnitud de aumento de CK en suero es proporcional al volumen (Montero Pérez *et al.* 1996) y a la sustancia inyectada (Ihedioha *et al.* 2005); o también, las cirugías en las cuales dado que se produce daño muscular se da un incremento de CK en suero que, además, de forma lógica, es significativamente superior en las cirugías o procedimientos mayores que en las cirugías menores (Yousef *et al.* 2006).

Además de en condiciones patológicas, también pueden darse aumentos de CK en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, después de un ejercicio extenuante, el cual daña la estructura de las células músculo esqueléticas a nivel del sarcolema y las líneas Z (Hornemann *et al.* 2000) resultando en un incremento de la CK total (Noakes 1987; Epstein 1995). Cuando la intensidad del ejercicio está dentro del rango metabólico normal, el músculo se ejercita sin producirse cambios relevantes en la permeabilidad de la membrana, sin embargo, si el ejercicio excede dicho rango, la permeabilidad cambia y se liberan las enzimas contenidas (Bijsterbosch *et al.* 1985; Brancaccio *et al.* 2008).

Aspartato aminotransferasa (AST)

La AST es una enzima aminotransferasa, con un peso molecular de 90 KDa, que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, en especial en el corazón, el hígado y el tejido muscular. Aunque en el músculo esquelético supone solo una décima parte de la actividad de AST en los hepatocitos (Wroblewski 1959).

Esta enzima cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde el L-aspartato al 2-oxoglutarato formándose L-glutamato y oxalacetato (Figura 4). Existen dos tipos de AST, la AST-S que se localiza en el citoplasma y la AST-M que se localiza en las mitocondrias (Ohno *et al.* 1978; Ohno *et al.* 1982).

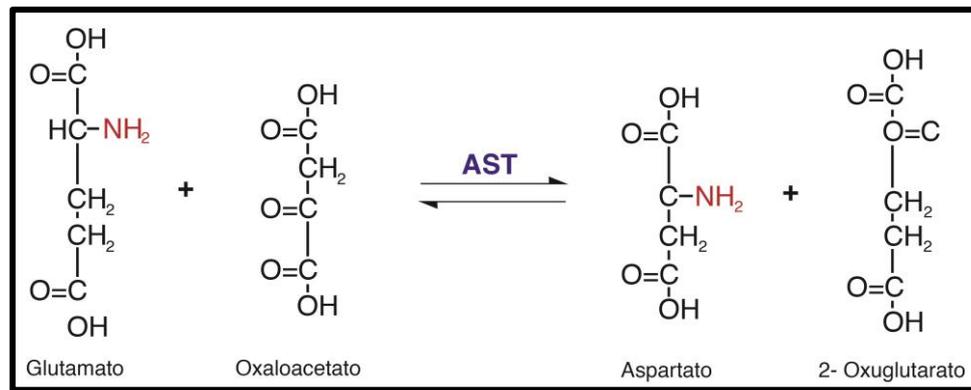


Figura 4. Función biológica de la AST. Fuente: Adaptado de <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/amino-acid-metabolism-sp.php>

Su incremento en condiciones patológicas en suero puede deberse a casos de infarto agudo de miocardio, hepatopatías, miopatías y a cualquier enfermedad o trastorno en el cual se produzca un daño celular (Wróblewski and LaDue 1956; Kunutsor *et al.* 2014). Por ejemplo, se pueden observar incrementos significativos en pacientes con distrofias musculares habiéndose establecido incluso, diferencias en los niveles según el tipo de distrofia (El-Bohy and Wong 2005).

En condiciones fisiológicas, tras un ejercicio extenuante como en maratones, se han reportado incrementos en las concentraciones de este marcador en suero (Soeder *et al.* 1989; Lippi *et al.* 2011), aumentos que sugieren un daño muscular (Bird *et al.* 2014).

Lactato deshidrogenasa (LDH)

LDH es una enzima, con una masa molecular de 140 KDa, que cataliza el paso de piruvato a lactato (Figura 5), a través de la oxidación del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH a NAD). Se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, músculo, glóbulos rojos y pulmones. Se conocen tres tipos de subunidades: H (LDHA), M (LDHB) y X (LDHC). Los tipos H y M pueden asociarse independientemente para formar tetrámeros, dando lugar a cinco isoenzimas o isoformas, cada una de las cuales se encuentra preferentemente en determinados tejidos (Wolf 1985; Koukourakis *et al.* 2003; Brancaccio *et al.* 2008).

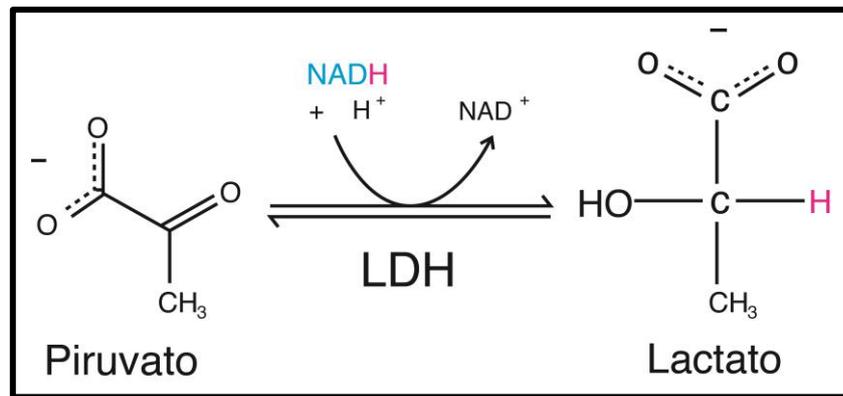


Figura 5. Función biológica de LDH. Fuente:

http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/BBM-II_farmacia/T4-piruvato-pagina.pdf

De tal forma que LDH-1 (H4) se encuentra principalmente en el corazón y en los eritrocitos. LDH-2 (H3M) en el sistema reticuloendotelial y leucocitos. LDH-3 (H2M2) en los pulmones y, por último, LDH-4 y LDH-5 se encuentran, sobretodo, en el músculo esquelético. De forma general niveles altos de LDH en sangre constituyen un indicador de lesión celular o tisular (Cabello *et al.* 1980; Bhagavan *et al.* 1982).

En condiciones normales los niveles totales de LDH se corresponden de forma mayoritaria a la isoforma LDH-1 (Koukourakis *et al.* 2003). No obstante dichos niveles totales dependen de muchos factores como la edad, el sexo, la masa muscular, la raza, el clima (Strømme *et al.* 2004), e incluso del momento del día, pues los niveles pueden verse influidos por el ritmo circadiano (Rivera-Coll *et al.* 1993).

LDH se constituye como un marcador de daño celular, ante lo cual el aumento específico de alguna de sus isoformas puede ser de utilidad como herramienta diagnóstica. Por ejemplo, en la rabdomiolisis aguda no traumática, se ha observado un incremento significativo de LDH, con una mayor presentación de la isoforma LDH-5 (Sanchez Navarro *et al.* 1998), al igual que ocurre en varios tipos de cáncer (Song *et al.* 1996; Ruggeri *et al.* 1998; Chuang *et al.* 2000), aunque existen otros marcadores tumorales que pueden proporcionar más información diagnóstica que LDH (Qie *et al.* 1996; Bast *et al.* 2005).

La variación en el patrón de distribución de las isoenzimas de LDH puede ser de utilidad para el diagnóstico diferencial entre la miopatía progresiva y la enfermedad

neuromuscular no progresiva (Hooshmand 1975). De hecho, con la progresión de la miopatía se da una disminución de LDH-M y un incremento de LDH-H, con un ratio M/H inferior en el músculo gravemente dañado (Ibrahim *et al.* 1981). Estas variaciones también se han encontrado en los portadores del gen de la distrofia, en los cuales hay una variación entre LDH-4 y LDH-5, que aumentan con respecto a LDH-1 y LDH-2 (Górecka 1975).

La LDH también puede aumentar en suero después del ejercicio físico (Mena *et al.* 1996; Brancaccio *et al.* 2008), dependiendo dicho aumento del nivel y la duración del esfuerzo (Stokke 1982). De hecho, tras un ejercicio prolongado los niveles pueden duplicarse y permanecer elevados hasta dos semanas después (Kobayashi *et al.* 2005). Sin embargo, cabe destacar que, aunque tras el ejercicio se produce un aumento de LDH, las fracciones isoenzimáticas se mantienen inalteradas, no habiendo cambios en los ratios de estas (Wolf *et al.* 1987; Nosaka *et al.* 1992).

Estudios de CK, AST y LDH en saliva en diferentes procesos patológicos

Aunque no se han publicado hasta la fecha estudios de marcadores enzimáticos en saliva para evaluar daño en músculo esquelético, si se han realizado algunos estudios sobre el comportamiento de dichos marcadores bajo condiciones de infarto de miocardio, enfermedad periodontal y úlcera péptica.

El infarto de miocardio es la mayor causa de muerte a nivel mundial (Mueller *et al.* 2008). La pérdida de la integridad de la membrana plasmática producida en los procesos de necrosis miocárdica se acompaña de la liberación de proteínas estructurales y otras moléculas intracelulares, estas moléculas entran en el torrente sanguíneo y son importantes para el diagnóstico del infarto de miocardio. Entre estas

sustancias, el comportamiento de la CK en suero se ha utilizado como marcador de la enfermedad cardíaca (Zhang 2005). En el infarto agudo de miocardio, CK se incrementa a las 4 horas, llegando a su valor máximo en torno a las 12 horas y retornando a valores normales a las 24-72 horas después del infarto (Puleo and Roberts 1988; Short, SG and Clements, SD 1993).

En un estudio con pacientes con infarto agudo de miocardio se detectó un incremento de los valores de CK en saliva el primer y segundo día tras el infarto, observándose una moderada correlación entre las concentraciones de saliva y suero. Los valores detectados en suero tanto en los sujetos control como en los pacientes con infarto agudo de miocardio fueron en torno a 10 veces superiores a los valores detectados en saliva (Mirzaii-Dizgah and Jafari-Sabet 2011).

En otro estudio se observó un aumento de CK-MB en saliva un día después del infarto de miocardio en comparación a los sujetos control y se halló una alta correlación entre las concentraciones de CK-MB en suero y saliva. En este caso, aunque en suero los niveles de CK-MB también eran más altos, no llegaban a ser 2 veces las concentraciones de CK-MB en saliva (Mirzaii-Dizgah *et al.* 2011).

En lo que se refiere a la enfermedad periodontal en un estudio se midieron los niveles en saliva de CK, AST y LDH en pacientes sanos y en pacientes con enfermedad periodontal antes del tratamiento y posteriormente a un tratamiento convencional, observándose valores superiores, aproximadamente 10 veces más, en todas las enzimas al comparar los sujetos control con los sujetos con enfermedad periodontal antes del tratamiento. Después del tratamiento de la enfermedad periodontal también se observaban diferencias significativas, tanto con el grupo control, incrementados, como con el grupo sin tratamiento, disminuidos (Todorovic *et al.* 2006). En esta misma línea, otro estudio evaluó la actividad enzimática de LDH en saliva, determinando que en los pacientes con enfermedad periodontal los valores eran superiores en comparación con los sujetos sanos (Alonso De La Peña *et al.* 2007), al igual que ocurre con la AST (Cesco *et al.* 2003; Luke *et al.* 2015).

También se ha medido la AST en saliva en pacientes con úlceras pépticas, encontrándose valores ligeramente más elevados en los pacientes con respecto a los sujetos control (Boghor *et al.* 2014).

Estudios de almacenamiento y conservación de la saliva como muestra biológica

Existen estudios sobre la estabilidad de los esteroides en saliva bajo la influencia de diferentes condiciones de conservación (Gröschl *et al.* 2001; Toone *et al.* 2013). Además hay trabajos sobre la estabilidad de otros analitos en saliva como la cromogranina A (Escribano *et al.* 2014), lisozima, inmunoglobulina A (Ng *et al.* 2003), glutatión y malondialdehído (Emekli-Alturfan *et al.* 2009; Emekli-Alturfan *et al.* 2013).

En el caso de las diferentes enzimas relacionadas con el daño muscular en saliva, se ha estudiado la LDH a temperatura ambiente, refrigeración y a -20°C. A temperatura ambiente y bajo condiciones de refrigeración, la LDH se mantuvo estable durante 3

meses. Sin embargo, a -20°C se alteraban los valores enzimáticos a los 30 minutos tras la congelación (Alonso de la Peña *et al.* 2004).

Material y Métodos

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Material y Métodos

En este trabajo se han realizado cuatro estudios diferentes que se corresponden con los cuatro objetivos de la Tesis.

En primer lugar se van a exponer los materiales y métodos comunes para los cuatro estudios y posteriormente las particularidades de cada uno de ellos.

Materiales y métodos comunes

Materiales y fármacos

- Tubos estériles (PRGF Fractionation tube no aditive[®], BTI, Vitoria, España).
- Centrifugadora (Centrifuga P Selecta[®], JP Selecta S.A, Barcelona, España).
- Viales de polipropileno eppendorf (Tubo de microcentrífuga 1.5 ml, Daslab, Barcelona, España).
- Salivette (Salivette[®], Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Alemania).
- Micropipetas de 200 y de 1000 μ L (Exacta[®], Madrid, España).
- Analizador bioquímico automático (ADVIA 120, Siemens, USA).
- Software informático (Graph Pad Prism[®], Versión 5, San Diego, California, USA)
- Tubos lisos convencionales (Vacutainer[®], Plymouth, Reino Unido)
- Tubos con EDTA (AQUISEL K3E/EDTA 3K[®], AQUISEL, Barcelona, España).
- Tubos sin anticoagulante de 5 ml (BD. Vacutainer[®], Plymouth, Reino Unido).
- Alfaxolona (Alfaxan 10mg/ml[®], Dechra Veterinary Products SLU, Barcelona, España)
- Midazolam (Midazolam Hospira 1mg/ml[®], Roche, Madrid, España).
- Morfina (Cloruro mórfico 2%[®], B-Braun, Melsungen, Alemania).
- Sevoflurano 100% (Sevoflo[®], EsteveVeterinaria, Barcelona, España).
- Cefazolina (Cefazolina Normon[®] 1 gr, Normon, Madrid, España).

Instalaciones

Las muestras se analizaron, en los laboratorios del grupo de investigación “Interlab-UMU”, de la Universidad de Murcia.

Los procedimientos quirúrgicos en animales se realizaron en el Hospital Veterinario de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

Todos los estudios fueron aprobados por los comités de ética correspondientes.

Análisis enzimático

CK se midió mediante un kit comercial (Beckman Coulter, Brea, EE.UU.) basado en la cuantificación de formación de NADPH derivado de la acción de CK sobre la fosfocreatina y ADP, tal y como recomienda la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina Laboratorial (IFCC).

AST se midió también mediante un kit comercial (Beckman Coulter, Brea, EE.UU.) basado en la cuantificación de NADPH consumido derivado de la acción de AST sobre aspartato y oxoglutarato, tal y como recomienda la IFCC.

Por último, LDH se midió mediante un kit comercial (BioSystems S.A., Barcelona, España) basado en la conversión de piruvato a lactato en presencia de NADPH.

Todos los análisis fueron previamente validados para su uso en saliva. Los calibradores fueron los proporcionados por el fabricante de los kits comerciales. Todas las mediciones se realizaron a 37°C en un analizador bioquímico automático (Olympus A400, Hamburg, Germany).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante estadística descriptiva y con un software informático apropiado (Graph Pad Prism, Versión 5, San Diego, California, USA).

Se evaluó, usando el test de normalidad estadística *D'Agostino & Person*, si los resultados de los valores de CK, AST y LDH en saliva seguían una distribución normal. Dado que la mayoría de los conjuntos de datos no mostraron una distribución normal, se optó por la utilización de test no paramétricos para el análisis estadístico.

Se evaluaron las diferencias entre las concentraciones de las diferentes alícuotas usando el test de *Friedman* seguido por el test de *Dunn's*. Se comprobó la existencia de correlaciones entre las variables usando el coeficiente de correlación de *Spearman*.

Los coeficientes de variación de los análisis se calcularon dividiendo la desviación estándar entre el valor medio de las réplicas analizadas y expresando el resultado porcentualmente (%).

En todas las variables evaluadas se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas con los valores de $P < 0.05$.

Efecto de diferentes métodos de colección de saliva y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH

Sujetos

En este estudio participaron 17 personas. Fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Murcia y todos los participantes firmaron un consentimiento informado.

Los participantes fueron 11 mujeres, con edades comprendidas entre los 28 y los 58 años, y 6 hombres, con edades entre los 28 y los 62 años, que declararon estar sanos y recibieron instrucciones verbales sobre los procedimientos para la obtención de muestras de saliva.

Criterios de inclusión y exclusión

Para eliminar variaciones externas, se determinaron como criterios de exclusión la presencia de cualquier enfermedad, sobretodo enfermedades orales (gingivitis o enfermedad periodontal), enfermedades autoinmunes, infecciosas, musculoesqueléticas, tumorales y, también, procedimientos quirúrgicos o traumatismos recientes. Para esto los sujetos rellenaron un cuestionario con preguntas concretas sobre su estado de salud.

Los participantes debían abstenerse de comer, de lavarse los dientes, del uso de enjuague bucal, goma de mascar y/o fumar durante la hora previa a la obtención de las muestras.

Protocolo de obtención de muestras y grupos

Las muestras de saliva se obtuvieron mediante salivación pasiva, por parte de todos los participantes, en tubos estériles de 10 ml durante 2 minutos.

El estudio se dividió en dos partes, donde se evaluó el efecto sobre las enzimas de: (1) diferentes métodos de procesado y (2) de distinta condiciones de centrifugación.

Para la primera parte, una vez obtenida la muestra principal, se dividió en tres alícuotas que se procesaron de la siguiente forma (Tabla 4):

- Sin ningún tratamiento.
- Sometida a una centrifugación de 10000 x g durante 10 minutos a 4°C (Todorovic *et al.* 2006; Mohamed *et al.* 2012), el sobrenadante se traspasó a viales de polipropileno y se analizó.
- En la que se introdujo un algodón del kit comercial Salivette® durante 5 minutos para absorber la muestra y posteriormente se centrifugó el algodón a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un vial de polipropileno y se analizó.

| Tabla 4. División métodos de colección de muestras | |
|--|--------------------------------------|
| MUESTRA (n = 17) | Alícuota 1: no tratada |
| | Alícuota 2: centrifugada |
| | Alícuota 3: algodón + centrifugación |

Para la segunda parte del estudio, con el fin de evaluar el efecto de distintas condiciones de centrifugación sobre la muestra, 5 alícuotas de una muestra obtenida sin ningún tratamiento se centrifugaron a diferentes velocidades y tiempos (Tabla 5).

| Tabla 5. División métodos de centrifugación de muestras para su posterior análisis. | |
|---|---|
| MUESTRA | NO CENTRIFUGADA |
| | C1: Centrifugación 10000 x g 10 minutos a 4°C |
| | C2: Centrifugación 10000 x g 5 minutos a 4°C |
| | C3: Centrifugación 5000 x g 10 minutos a 4°C |
| | C4: Centrifugación 5000 x g 5 minutos a 4°C |

Además de todo lo descrito, en orden de evaluar la posible variación de precisión de los tres métodos debido a la centrifugación, se calcularon los coeficientes de variación (intra e inter-ensayo) utilizando muestras de saliva “no tratada” y “centrifugada”. Para

ello, tres muestras de saliva se dividieron en 2 alícuotas, una de las cuales fue “no tratada” y otra centrifugada a 10000 x g 10 minutos a 4°C.

La variabilidad intra-ensayo se calculó cinco veces en un mismo ensayo tras el análisis de las muestras de saliva. Mientras que la variabilidad inter-ensayo se determinó analizando la misma muestra en 5 ensayos diferentes, llevados a cabo en 5 días consecutivos.

Para evitar los posibles cambios que pudiesen darse al congelar y descongelar de forma repetitiva, las muestras se congelaron en alícuotas a -80°C y únicamente se utilizaron las necesarias para cada análisis.

Análisis enzimático

Sigue el análisis enzimático común.

Análisis estadístico

Sigue el análisis estadístico común.

Efecto de diferentes tipos de almacenamiento sobre CK, AST y LDH.

Sujetos

Se obtuvieron muestras de saliva no tratadas de tres individuos.

Criterios de exclusión

Los participantes en el estudio debían cumplir las normas referenciadas en el estudio anterior. Estableciéndose los mismos criterios de exclusión.

Protocolo de obtención y conservación de muestras.

Se prepararon dos alícuotas de cada una de las tres muestras (Figura 6). Para evaluar los efectos de los ciclos de congelación y descongelación (Tabla 6) y, las diferentes condiciones de almacenamiento sobre CK, AST y LDH (Tabla 7).

Para la evaluación del efecto de los ciclos de congelación-descongelación (1) sobre las enzimas se congeló una subalícuota a -20°C y otra a -80°C (Figura 6). Se evaluaron 8 ciclos congelación-descongelación, coincidentes con los tiempos descritos más adelante.

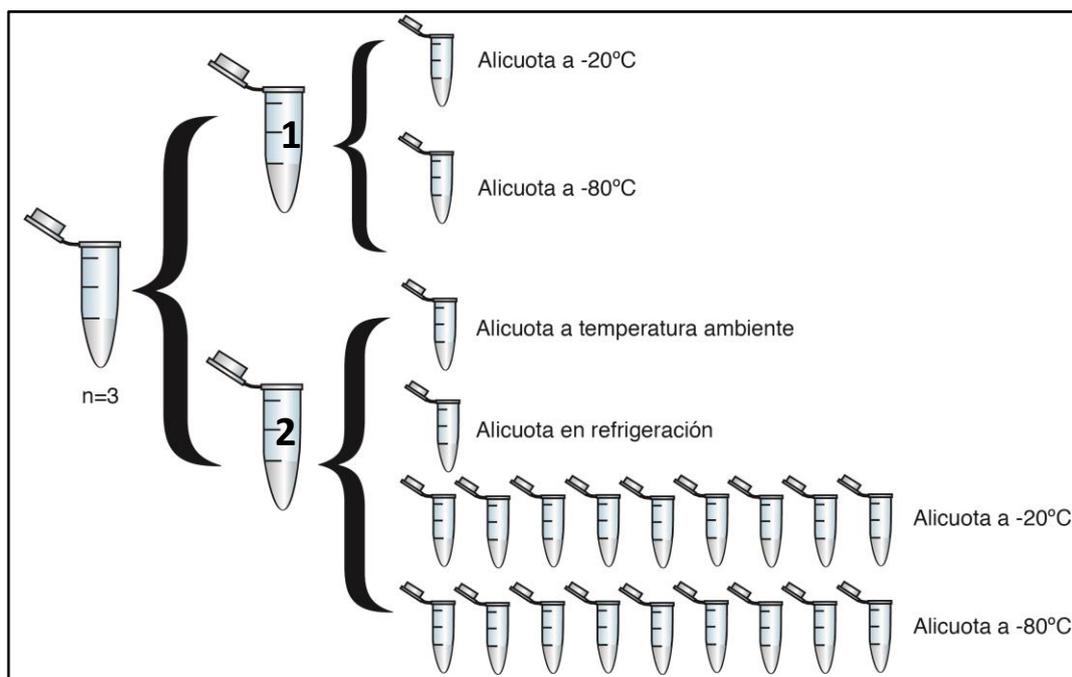


Figura 6. Esquema del protocolo de obtención de alícuotas para el estudio del efecto de los ciclos de congelación-descongelación (1) y de las condiciones de almacenamiento (2).

| Tabla 6. Grupo ciclos de congelación-descongelación. | |
|--|--|
| Alícuota 1 | Las muestras se congelan a -20°C y se descongelan antes del análisis |
| Alícuota 2 | Las muestras se congelan a -80°C y se descongelan antes del análisis |

Para la evaluación de las diferentes condiciones de almacenamiento (2) se hicieron 20 subalícuotas (Figura 6) de cada una de las tres muestras (Tabla 7). Una subalícuota de cada muestra se almacenó a temperatura ambiente (TA). Una segunda subalícuota de cada muestra se refrigeró a 4°C (R). Se congelaron 9 subalícuotas a -20°C (C-20) y otras 9 a -80°C (C-80) de cada muestra y tras la realización de cada análisis enzimático se desechaba la subalícuota.

| Tabla 7. Grupos para evaluación de los diferentes tipos de almacenamiento. | |
|--|---|
| AT | Muestras almacenadas a temperatura ambiente ($\pm 21^{\circ}\text{C}$). 1 subalícuota x (n=3). |
| R | Muestras almacenadas a 4°C en un refrigerador. 1 subalícuota x (n=3). |
| C-20 | Muestras almacenadas a -20°C . 9 subalícuotas x (n=3). |
| C-80 | Muestras almacenadas a -80°C . 9 subalícuotas x (n=3). |

Las subalícuotas se analizaron de forma inmediata (T0), a los 30 minutos (T1), 3 horas (T2), 6 horas (T3), 24 horas (T4), 7 días (T5), 1 mes (T6), 3 meses (T7) y un año (T8) tras su obtención (Tabla 8).

| Tabla 8. Tiempo de análisis de las muestras. | |
|--|--|
| T0 | Análisis inmediato tras obtención de las muestras. |
| T1 | Análisis 30 minutos después de la obtención de las muestras. |
| T2 | Análisis 3 horas después de la obtención de las muestras. |
| T3 | Análisis 6 horas después de la obtención de las muestras. |
| T4 | Análisis 24 horas después de la obtención de las muestras. |
| T5 | Análisis 7 días después de la obtención de las muestras. |
| T6 | Análisis 1 mes después de la obtención de las muestras. |
| T7 | Análisis 3 meses después de la obtención de las muestras. |
| T8 | Análisis 1 año después de la obtención de las muestras. |

Las enzimas se midieron mediante kits comerciales previamente validados para su uso en saliva, tal como se indica en el punto de análisis enzimático común.

Análisis estadístico

Sigue el análisis estadístico común.

Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en perro

Animales para el estudio

Los animales que se emplearon para este estudio fueron de la especie canina (*Canis lupus familiaris*). Un total de 24 hembras adultas, mestizas, sanas, que procedían de la Sociedad Valenciana de Protección de Animales y Plantas (SVPAP). Con una edad media de 5 ± 2 años, un peso medio de 20.3 ± 7.2 Kg y una condición corporal de 4-5, evaluada en base a una escala de 9 puntos (Laflamme D P 1997).

El modelo animal de daño muscular, consistió en someter a los sujetos del estudio a un procedimiento quirúrgico convencional: ovariectomía por el flanco.

Criterios de exclusión

En aras de detectar anomalías que pudieran introducir variaciones en los resultados del estudio, como por ejemplo enfermedades hepáticas o periodontales (Ozmeric 2004; Todorovic *et al.* 2006), se realizó una evaluación preanestésica, consistente en un examen físico, medición del pulso, auscultación pulmonar y cardíaca, palpación abdominal, palpación de ganglios linfáticos y observación minuciosa de la cavidad oral. Al anterior punto se unió un análisis hematológico y bioquímico rutinario.

Se excluyeron los datos de aquellos animales que presentaron alguna anomalía detectada en el examen físico o en las analíticas, prestando especial atención a la presencia de enfermedad periodontal evidente, dado que hay estudios sobre ambos analitos que indican que pueden aumentar en presencia de enfermedades periodontales (Todorovic *et al.* 2006; Luke *et al.* 2015).

También se excluyeron los perros con niveles de CK y AST mayores a 250 UI/L y 50 UI/L respectivamente, valores que son el límite superior del intervalo de referencia del laboratorio.

Por último, se excluyeron también aquellos sujetos cuyas muestras de saliva no fueron lo suficientemente abundantes como para realizar el análisis enzimático.

Protocolo quirúrgico

Las ovariectomías por el flanco se realizaron en los meses de mayo y junio de 2014, siguiendo un procedimiento previamente publicado (Howe 2006).

Previamente a la cirugía se llevó a cabo el siguiente protocolo analgésico y anestésico: 5 mg/Kg intramuscular de Alfaxolona (Alfaxan® 10 mg/ml; Dechra Veterinary Products SLU; Barcelona; España), 0.1 mg/Kg intramuscular de Midazolam (Midazolam Hospira® 1 mg/ml, Roche, Madrid, España), 0.4 mg/Kg intramuscular de morfina (Cloruro mórfico 2%®, B-Braun, Melsungen, Alemania), inducción con Alfaxolona 3 mg/Kg intravascular. Mantenimiento con sevoflurano (Sevoflo®, EsteveVeterinaria, Barcelona, España) disuelto en oxígeno.

En cuanto al protocolo quirúrgico se minimizaron, en la medida de lo posible, las variaciones, al realizarlo el mismo equipo quirúrgico, en horas similares, en todas las ovariectomías y accediendo por el flanco.

Postquirúrgicamente, se realizó la limpieza de la zona quirúrgica, por un lado, y la administración de Cefazolina (Cefazolina Normon® 1 gr, Normon, Madrid, España) 20 mg/Kg cada 12 horas, durante 7 días, por otro.

Protocolo obtención de muestras

En lo que se refiere al protocolo de obtención de muestras, las muestras de saliva (<1 ml) y sangre (2 ml) se obtuvieron antes de la cirugía (T1), 24 horas (T2) y 3 días (T3) después de la misma (Tabla 9). Las muestras se recogieron siempre a las 09:00 am, tras 14 horas de ayuno.

| Tabla 9. Grupos para evaluación de los diferentes tipos de almacenamiento. | |
|---|--|
| T1 | Muestras antes de la cirugía |
| T2 | Muestras obtenidas 24 horas post-cirugía |
| T3 | Muestras obtenidas 3 días post-cirugía |

Las muestras de saliva se obtuvieron colocando una esponja en la boca de cada animal, dejándola en contacto con la mucosa del carrillo durante 1 o 2 minutos, posteriormente se colocaron en el tubo Salivette® para su centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos (Parra *et al.* 2005; Tvarijonaviciute *et al.* 2014), y se almacenaron a la temperatura de -80°C hasta su análisis.

Por otro lado, después de la recogida de saliva, se tomaban las muestras de sangre mediante procedimiento clínico convencional, extrayéndose de la yugular en tubos lisos convencionales, y centrifugándose a 2000 x g durante 10 minutos, para cuidadosamente separar el suero y congelarlo a -80°C.

Análisis enzimático

En lo que refiere al análisis de las muestras, estas se transportaron al Interlab-UMU, en condiciones adecuadas: en un recipiente isoterma y con hielo seco. Todas las muestras se analizaron en el mismo día.

Se evaluaron, para ambos análisis, la precisión intra-ensayo (repetibilidad), la precisión inter-ensayo (precisión intermedia) y la linealidad a través del coeficiente de correlación.

El análisis enzimático sigue lo descrito en el apartado análisis enzimático común.

Análisis estadístico

Sigue el análisis estadístico común.

Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en humanos

El objetivo de esta última parte, fue evaluar los cambios en CK, AST y LDH en saliva antes y después de un ejercicio intenso en humana. Para ello, estas tres enzimas se midieron antes y después de un partido de fútbol sala en saliva y en suero.

Además, dado que el flujo salival (ml/min) se configura como una herramienta importante en la medición de analitos en saliva, se optó por expresar los resultados sin corregir y corregidos por el flujo salival.

Sujetos

Las muestras de saliva y sangre se obtuvieron de 7 sujetos, sanos, con una media de edad de 21.6 ± 1.2 años, una media de peso de 74.2 ± 5.1 Kg y una media de altura de 1.73 ± 4 cm. Todos los participantes dieron su consentimiento por escrito para participar en esta prueba.

Instrucciones y criterios de inclusión y exclusión

Todos los participantes debían competir al menos 30 minutos de los 40 minutos que duraba el partido de fútbol sala.

Durante las dos semanas previas a la obtención de las muestras y durante el procedimiento experimental se requirió a los participantes que no variasen sus hábitos alimenticios y se abstuviesen de tomar suplementos alimenticios.

También se les indicó que debían abstenerse de realizar ejercicio físico durante las 72 horas previas y las 24 horas posteriores al encuentro.

Para cuantificar la intensidad del partido se utilizó el Índice de Esfuerzo Percibido (RPE, del inglés *rating of perceived exertion*), obteniéndose después del encuentro en base a la escala de Borg "CR-10" (Borg *et al.* 1985) para todos los jugadores, los cuales recibieron instrucciones previas sobre dicho índice para valorar el esfuerzo.

Los participantes debían respetar de forma previa a la obtención de cada muestra un ayuno de 10 horas, excepto para la muestra T1 (30 minutos después del partido).

Por último, se les informó convenientemente, por escrito y de forma verbal, de los tiempos y procedimiento de obtención de las muestras, destacando que evitasen toser o aclarar la garganta, que se abstuviesen de comer, lavarse o enjuagarse los dientes, mascar chicle, entre otros, la hora previa a la obtención de las muestras de saliva. No obstante, si se permitió beber agua “ad libitum” durante el partido, cuando fuese posible.

Protocolo de obtención y conservación de muestras

Las muestras de saliva se obtuvieron por salivación sin estimulación durante un minuto dentro de un tubo de centrifuga de 10 ml estéril. Se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

El flujo salival se calculó dividiendo el volumen de saliva obtenido por el tiempo de colección. Para la determinación del volumen de saliva se pesaba la muestra de saliva junto con el tubo que la contenía y a continuación se restaba el peso de este último y se consideraban los gramos de saliva equivalentes a mililitros (Mirzaii-Dizgah *et al.* 2011).

Las muestras de sangre se obtuvieron por el procedimiento clínico convencional a través de la vena antecubital en tubos con EDTA y sin anticoagulante. Se determinó el hematocrito en las muestras de los tubos con EDTA utilizando un analizador automático. Las otras muestras se centrifugaron a 2000 x g durante 10 minutos para obtener el suero, el cual se congeló a -80°C hasta el análisis.

El protocolo de obtención de muestras (Tabla 10) consistió en la obtención de muestras antes del partido (T0) y 30 minutos (T1), 12 horas (T2) y 24 horas (T3) después del mismo.

| Tabla 10. Tiempos de obtención de muestras. | |
|--|---------------------------------|
| T0 | Antes del partido. |
| T1 | 30 minutos después del partido. |
| T2 | 12 horas después del partido. |
| T3 | 24 horas después del partido. |

Se citó a los jugadores el día del partido a las 08:00 horas habiendo ayunado toda la noche y concretamente sin ingerir alimentos al menos en las últimas 10 horas, de este modo se obtuvieron las muestras T0. Las muestras T1 se obtuvieron 30 minutos después del partido. Las muestras T2 y T3 se tomaron en el laboratorio a las 8:00 horas de la mañana del día respectivo, previo ayuno durante la noche.

Análisis enzimático

Los resultados se expresaron en actividad enzimática (IU/L) y corregidos por el flujo de salivación, concretamente multiplicando la actividad enzimática por dicho flujo.

Criterios de validación

Los ensayos se validaron siguiendo procedimientos previamente descritos para las muestras de saliva (Jaedicke *et al.* 2012; García-Tamez *et al.* 2012) en base a la recuperación, la linealidad, la variación intra- e inter-ensayo y la sensibilidad:

- Recuperación. Mediante el uso de calibradores comerciales tres concentraciones conocidas de cada uno de las enzimas se añadieron a las muestras de saliva de sujetos sanos control (n=7). Ambas muestras, a las que se les añadieron las concentraciones conocidas y a las que no, se analizaron de igual forma que las muestras analizadas en este estudio. Para cada enzima, se calculó el porcentaje de recuperación entre las tres muestras con adición de concentración conocida y su respectiva muestra sin adición en aras de comprobar la exactitud del ensayo.
- Linealidad. Se analizaron diluciones (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) de las muestras hechas con agua bidestilada para evaluar la linealidad del ensayo.
- Variación intra-ensayo e inter-ensayo. Por un lado se analizaron 5 réplicas de dos muestras distintas (con alta y baja actividad), para la variación intra-ensayo, y en 5 ensayos diferentes en diferentes días para evaluar la variación inter-ensayo.
- Sensibilidad. Para cuantificar la sensibilidad analítica se calculó el límite de detección. Para ello se analizaron 20 réplicas de agua destiladas. El límite de

detección se definió como la media de los resultados de las 20 réplicas más 2 desviaciones estándar de la media.

Análisis estadístico

Sigue el análisis estadístico común.

Resultados

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Resultados

A continuación se exponen los resultados obtenidos durante la fase experimental en los diferentes estudios, recogidos en Tablas y Figuras.

Efecto de diferentes métodos de colección de saliva y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH

Cuando se evaluó la influencia de la centrifugación en la precisión de las determinaciones, en las muestras que no se centrifugaron los coeficientes de variación intra-ensayo estaban por debajo del 23%, 20% y 8% para CK, AST y LDH, respectivamente. En las muestras centrifugadas los coeficientes de variación no llegaban a superar el 8%, el 6% y el 1% para CK, AST y LDH, respectivamente. Los coeficientes de variación inter-ensayo para CK, AST y LDH eran inferiores al 32%, 35% y al 15%, respectivamente, para las muestras de saliva no sometidas a centrifugación. En cuanto a las muestras centrifugadas los coeficientes de variación no superaron el 9%, el 11% y el 3%, respectivamente.

En la Tabla 11 se muestran los datos de CK, AST y LDH en las diferentes alícuotas: “no tratadas”, “centrifugadas” y centrifugadas con algodón (“algodón”). Se observa que los valores de CK y AST son 9.3 y 3.7 veces inferiores en las alícuotas sometidas a centrifugación en comparación con las alícuotas sin tratamiento ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente). Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre las diferentes condiciones de centrifugación: “C1”, “C2”, “C3”, “C4” (Tabla 12).

El uso de “algodón” produjo un descenso significativo de las concentraciones de las tres enzimas estudiadas en comparación con las no tratadas (Tabla 11). Sin embargo, únicamente se observaron descensos significativos para la LDH entre las muestras centrifugadas.

Por último, el test Spearman reveló una correlación estadísticamente significativa entre las alícuotas “no tratadas”, “las centrifugadas” y “algodón” para todas las enzimas evaluadas: CK, AST y LDH (Tabla 13).

Tabla 11. Mediana y rango de CK, AST y LDH bajo diferentes métodos de procesado.

| Alícuota | CK | AST | LDH |
|--------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| No tratada | 256.7 (41.4-1276.8) | 53.6 (10.7-420.9) | 313.5 (46.9-847.8) |
| Centrifugada | 27.7 (3.8-86.5) ^a | 14.3 (1.9-45.3) ^b | 378.9 (28.2-867.7) |
| Algodón | 18.6 (3.6-50.9) ^b | 13.6 (1.8-48.2) ^b | 168.2 (3.2-578.5) ^{b,c} |

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ en comparación con los valores de la alícuota "no tratada".

^c $P < 0.01$ en comparación con los valores obtenidos en la alícuota "centrifugada".

Tabla 12. Mediana y rango de los niveles enzimáticos (CK y AST) bajo diferentes condiciones de centrifugación.

| | No tratada | C1 | C2 | C3 | C4 |
|-----|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| CK | 21.8 (10.3-212.7) | 17.8 (5.7-37.4) | 15.8 (6.5-73.3) | 16.7 (5.3-30.1) | 16.6 (5.7-92.1) |
| AST | 18.1 (15.0-104.6) | 8.0 (4.8-39.4) | 7.2 (5.3-40.6) | 7.5 (5.0-40.7) | 8 (5.2-41.7) |

No tratada: no centrifugada. C1: centrifugada a 10000 x g durante 10 minutos a 4°C.

C2: centrifugada a 10000 x g durante 5 minutos a 4°C. C3: centrifugada a 5000 x g durante 10 minutos a 4°C. C4: centrifugada a 5000 x g durante 5 minutos a 4°C.

Tabla 13. Coeficientes de correlación de Spearman entre los valores enzimáticos de las muestras de los diferentes métodos de procesado.

| | Centrifugada Vs No tratada | | Algodón Vs No tratada | | Centrifugada Vs Algodón | |
|-----|----------------------------|----------|-----------------------|----------|-------------------------|----------|
| | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> | <i>r</i> | <i>P</i> |
| CK | 0.389 | 0.01 | 0.678 | 0.01 | 0.880 | <0.001 |
| AST | 0.825 | <0.001 | 0.8412 | <0.001 | 0.957 | <0.001 |
| LDH | 0.956 | <0.001 | 0.9455 | <0.001 | 0.926 | <0.001 |

Efecto de diferentes tipos de almacenamiento sobre CK, LDH y AST

En las Tablas 14, 15 y 16 se exponen los resultados obtenidos en las diferentes condiciones de almacenamiento para los valores de CK, AST y LDH, respectivamente. Los resultados se muestran como medias (IU/L) en todas ellas, comparándose con el resultado “control” que corresponde a la media de los resultados de las muestras analizadas en T0 para cada analito. Los superíndices “a y b” indican la existencia de diferencias significativas, siendo “a” $p < 0.05$ y “b” $p < 0.01$.

A continuación de cada tabla, se presentan los datos en gráficas, concretamente en las Figuras 6, 7 y 8, para los niveles de CK, AST y LDH, respectivamente, representados como la media de los resultados obtenidos con el error estándar.

Los valores de CK (Tabla 14 y Figura 7) mantenidos a temperatura ambiente y en refrigeración tuvieron aumentos y descensos, respectivamente, significativos a partir de T5 (7 días). A -20°C se observaron descensos a partir de T7 (3 meses), mientras que a -80°C no se evidenciaron cambios significativos. Los ciclos de congelación-descongelación produjeron descensos a partir de T7 a -20°C y no mostraron diferencias significativas a -80°C .

Los valores de AST (Tabla 15 y Figura 8) a temperatura ambiente mostraron un descenso significativo a partir de T3 (6 horas). En refrigeración aumentos significativos y a -20°C descensos significativos al mes. No se evidenciaron cambios a -80°C . Los ciclos de congelación-descongelación produjeron descensos a partir de T5 a -20°C y se hallaron diferencias significativas en T8 a -80°C .

Por último los valores de LDH (Tabla 16 y Figura 9) mostraron descensos a partir de T4 (24 horas) a temperatura ambiente, y a partir de T5 (7 días) en condiciones de refrigeración. En cuanto a congelación, aparecieron descensos significativos a partir de T4 (24 horas) a -20°C y a -80°C a partir de T6 (1 mes). En cuanto a los ciclos de congelación-descongelación, a -20°C se observaron diferencias a partir del segundo ciclo y no se observó ninguna diferencia a -80°C .

Tabla 14. Mediana y rango de CK (UI/L) bajo las diferentes condiciones de almacenamiento del estudio.

| | T0 (control) | T1 (30 min) | T2 (3 h) | T3 (6 h) | T4 (24 h) | T5 (7 d) | T6 (1 m) | T7 (3 m) | T8 (1 año) |
|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| TA | 19.4 (16,1-26,4) | 18.7 (14,2-32,4) | 17 (13,1-19,3) | 14.8 (11,6-20,6) | 10.2 (9,4-17,4) | 56.7 ^a (33,3-75,8) | 40.2 ^a (27,4-139,1) | 5.2 ^a (5,1-12,5) | 5.3 ^b (2,6-6,4) |
| R | | 19.7 (14-23,6) | 14.4 (14,1-19,7) | 16.8 (12,9-24,6) | 15.3 (13,1-17,3) | 11.6 ^a (8-12) | 10.2 ^a (6,7-12) | 54 (0,5-69,7) | 8.3 (6,6-39,8) |
| -20C | | 20.2 (14,5-20,7) | 18.9 (15-19,2) | 17.4 (11,9-22,2) | 16.5 (12,4-20,3) | 16.3 (14-18,1) | 14.1 (13,3-14,2) | 8.2 ^a (7,8-9,1) | 8.3 ^a (5,2-9,9) |
| -80C | | 20.3 (15,2-21,3) | 17.8 (13,3-24,3) | 17.2 (12,8-22,8) | 17.1 (13-21,9) | 16.7 (13,8-19,8) | 16 (14,4-20,7) | 12.4 (9,6-19,5) | 11.2 (9,8-14,7) |
| -20DC | | 20.2 (14,5-20,7) | 17.9 (12,8-25,4) | 18.9 (12-31,1) | 15 (11,7-28,5) | 14.7 (11,9-17,3) | 14.5 (11,4-21,1) | 7.5 ^a (5,6-14,1) | 7.4 ^a (3,8-7,4) |
| -80DC | | 20.3 (15,2-21,3) | 20 (14,3-36) | 17.8 (15,5-22,5) | 19.6 (16,4-24,7) | 17.8 (13-20,6) | 18.7 (15-32,5) | 19.6 (9,4-20,8) | 14.7 (10,9-15,1) |

Temperatura ambiente (TA), Refrigeración (R), Congeladas a -20°C (C-20), congeladas a -80°C (C-80).

Ciclos de congelación descongelación a -20°C (-20DC) y a -80°C (-80DC).

Los superíndices "a y b" indican la existencia de diferencias significativas con respecto al valor control, entendiéndose que a ($p < 0.05$) y b ($p < 0.01$).

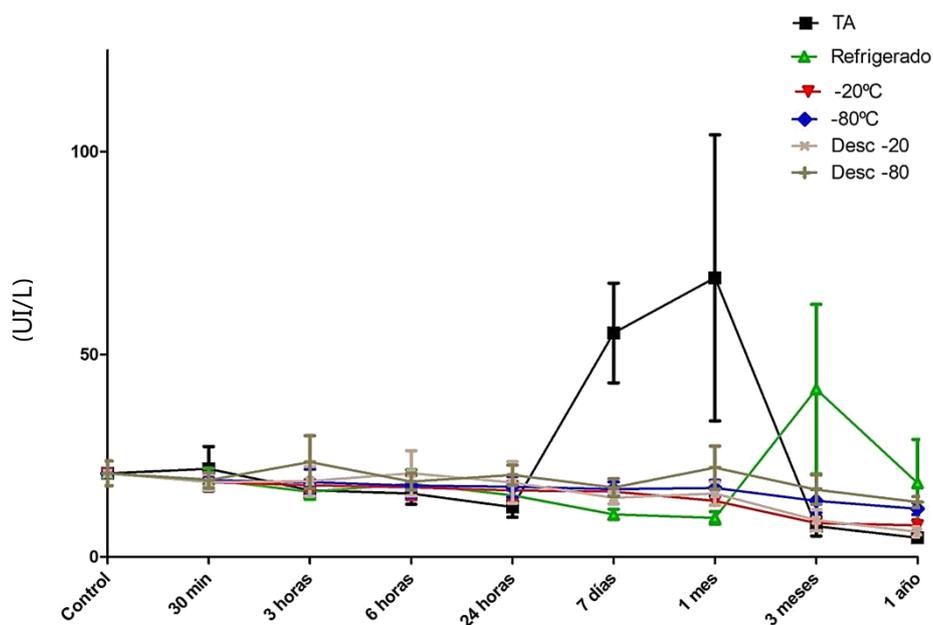


Figura 7. Estabilidad de CK (media y desviación estándar) en el tiempo ante diferentes tipos de almacenamiento.

Tabla 15. Mediana y rango de AST (UI/L) bajo las diferentes condiciones de almacenamiento del estudio.

| | T0 (control) | T1 (30 min) | T2 (3 h) | T3 (6 h) | T4 (24 h) | T5 (7 d) | T6 (1 m) | T7 (3 m) | T8 (1 año) |
|-------|-------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| TA | 26 (25,9-28,4) | 24.6 (23,8-26,8) | 23.4 (20,3-25,5) | 22.6 ^a (17,4-23) | 19.8 (11,9-22,4) | 106.3 ^a (96,6-134,5) | 149.1 ^b (130,1-218,4) | 20.5 (12,1-72,4) | 0.9 ^b (0,3-9,9) |
| R | | 25.3 (24,1-27,7) | 24.7 (24,1-26,7) | 24.3 (21,7-25,7) | 23.3 (17,4-23,5) | 37 (23,6-79,7) | 50.6 ^b (34,4-123,4) | 24.6 (14,9-27,5) | 2.9 ^b (1,8-3,5) |
| -20C | | 25.8 (25,2-27,9) | 26.1 (24,3-27,4) | 25.9 (21,7-27,2) | 23.9 (21,4-27,5) | 21.7 (20,5-26,8) | 19.1 ^a (18-23,8) | 15.4 ^a (15,3-22,2) | 10 ^a (3,1-17,6) |
| -80C | | 25.9 (25-28,4) | 25.8 (24,3-27,3) | 26.8 (23,5-27,4) | 26.8 (21,8-26,9) | 26.1 (20,9-26,7) | 25.4 (19,8-26,7) | 25.5 (19,1-27,2) | 22.6 (15,4-24,2) |
| -20DC | | 25.8 (25,2-27,9) | 24.9 (23,6-27) | 24.1 (22,3-26,9) | 23.9 (21,6-25,4) | 21.9 ^a (20,9-23,9) | 21.2 ^a (19,1-23,6) | 17.2 ^b (16,7-21,6) | 6.3 ^b (3,5-13,2) |
| -80DC | | 25.9 (25-28,4) | 25.1 (24,6-27,7) | 24.7 (24,3-27,7) | 24.7 (23,2-25,6) | 24.8 (23-26,4) | 24.9 (22,7-26,1) | 25.4 (23,5-26,3) | 22.9 ^a (20,3-24,3) |

Temperatura ambiente (TA), Refrigeración (R), Congeladas a -20°C (C-20), congeladas a -80°C (C-80).

Ciclos de congelación descongelación a -20°C (-20DC) y a -80°C (-80DC).

Los superíndices "a y b" indican la existencia de diferencias significativas con respecto al valor control, entendido que a ($p < 0.05$) y b ($p < 0.01$).

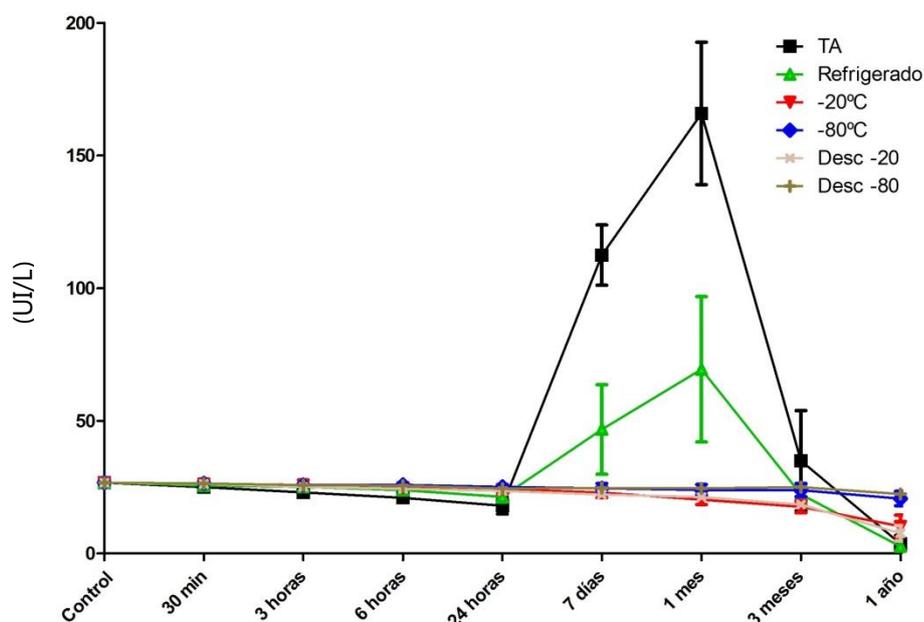


Figura 8. Estabilidad de AST (media y desviación estándar) en el tiempo ante diferentes tipos de almacenamiento.

Tabla 16. Mediana y rango de LDH (UI/L) bajo las diferentes condiciones de almacenamiento del estudio.

| | T0 (control) | T1 (30 min) | T2 (3 h) | T3 (6 h) | T4 (24 h) | T5 (7 d) | T6 (1 m) | T7 (3 m) | T8 (1 año) |
|-------|----------------------|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| TA | | 543.6 (486,6-610,1) | 527.4 (473-590,9) | 521.6 (457,5-574,3) | 409.8 ^a (327,9-425,1) | 260.7 ^a (247,4-264,3) | 71.9 ^b (146,3-36) | 7.6 ^b (0,9-20,7) | 0.9 ^b (-1,1-2,4) |
| R | | 539.6 (486,2-672,6) | 541.3 (479,7-593,8) | 526.5 (471,1-588,1) | 519.8 (434,7-554,6) | 379.1 ^a (320,3-421,7) | 276.5 ^a (114,4-345,4) | 45.6 ^b (12-133,7) | 10.5 ^b (0,3-42,7) |
| -20C | 536 (493,7-618,2) | 529 (485,2-594) | 486.8 (453,7-559,2) | 441.3 (435,6-485,8) | 383.9 ^a (363,8-390,1) | 239.2 ^b (213,4-290,5) | 147.3 ^b (101,8-182,3) | 78.1 ^b (49,6-92,6) | 5.3 ^b (-2,4-5,5) |
| -80C | | 542.9 (479,9-608,5) | 508.3 (478,2-580,4) | 487.7 (465,8-551,2) | 454.2 (450,4-520,9) | 424 (421,8-475,6) | 411.1 ^a (388-435,4) | 389.6 ^a (371-408,7) | 354.9 ^b (320,7-366,3) |
| -20DC | | 529 (485,2-594) | 430.6 ^a (413,9-438,7) | 405 ^a (395,9-408,7) | 383.9 ^a (367,6-386,6) | 306.2 ^b (262,8-322) | 250.7 ^b (246,2-264,1) | 195.1 ^b (156,2-196,4) | 6.4 ^b (1,6-8,3) |
| -80DC | | 542.9 (479,9-608,5) | 514.6 (472,9-593,6) | 503.6 (476,2-583,2) | 491 (476,5-575) | 466.9 (447,9-553,1) | 467.8 (466,5-548,8) | 491 (456,8-557,8) | 441.2 (440,4-535,4) |

Temperatura ambiente (TA), Refrigeración (R), Congeladas a -20°C (C-20), congeladas a -80°C (C-80).

Ciclos de congelación descongelación a -20°C (-20DC) y a -80°C (-80DC).

Los superíndices "a y b" indican la existencia de diferencias significativas con respecto al valor control, entendido que a ($p < 0.05$) y b ($p < 0.01$).

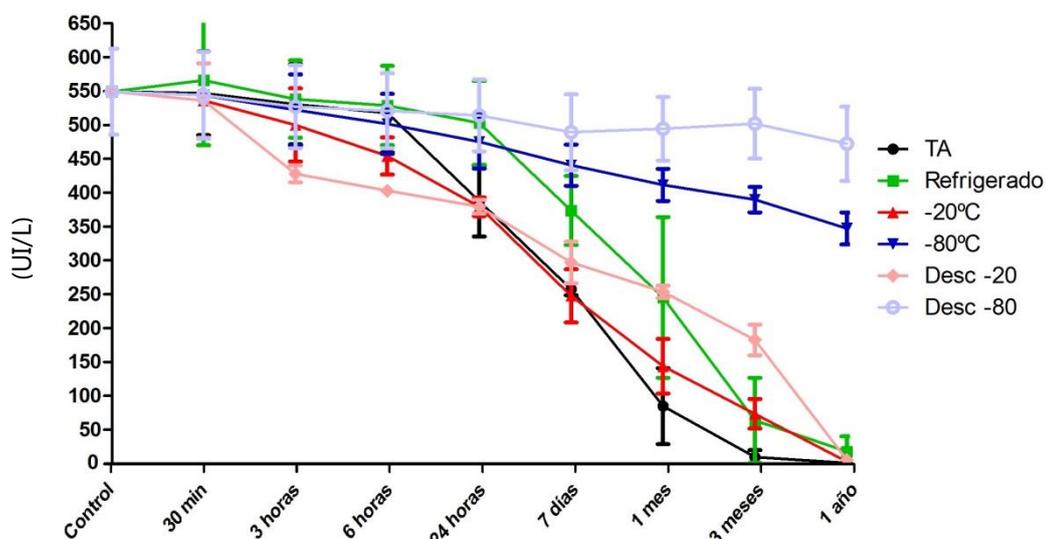


Figura 9. Estabilidad de LDH (media y desviación estándar) en el tiempo ante diferentes tipos de almacenamiento.

Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en perro

Los datos de evaluación analítica de las dos enzimas: CK y AST en saliva de perro mostraron una imprecisión intra-ensayo e inter-ensayo menor al 10%. Por su parte la evaluación de la linealidad mostró un coeficiente de correlación con un resultado próximo a 1. Los límites de detección fueron 2 IU/L para CK y 3 IU/L para AST.

De los 24 animales empleados en la prueba experimental para evaluar como una ovariectomía puede afectar a las enzimas en saliva, para el análisis estadístico se eliminaron los datos de 11 animales por no cumplir los criterios de inclusión. Concretamente 6 animales se eliminaron por altos niveles CK y AST en la primera muestra (CK y AST mayores a 250 UI/L y 50 UI/L, respectivamente), 3 animales se eliminaron del estudio por el bajo volumen obtenido como muestra y por último 2 animales se eliminaron del estudio por presentar enfermedad periodontal evidente.

El comportamiento de CK y AST antes y después de la cirugía se muestra en la Tabla 17 y Tabla 18, respectivamente. Paralelamente los datos han sido representados en las Figuras 10 y 11.

CK mostró un incremento significativo 24 horas post cirugía (T2) en saliva (1.46 veces; $p < 0.01$) y suero (3.13 veces; $p < 0.001$) con respecto al valor previo al procedimiento quirúrgico. AST se incrementó significativamente también a las 24 horas post cirugía (T2) en saliva (2.76 veces; $p < 0.01$) y en suero (1.84 veces; $p < 0.001$) con respecto al valor previo al procedimiento quirúrgico. A los 3 días post cirugía (T3) no se observaron incrementos significativos con respecto al valor prequirúrgico.

Se encontraron correlaciones significativas positivas entre los valores salivales y séricos de CK ($r = 0.390$ $p = 0.017$) y AST ($r = 0.333$ $p = 0.0439$).

Tabla 17. Mediana y rango de CK (UI/L) en saliva y suero.

| | T1 (pre) | T2 (24h) | T3 (3d) |
|--------|-----------------------|--|---------------------------------|
| Saliva | 42.8 (17.6-55.4) | 62.6 ^a (38.3-327) (1.46) | 81.1 (12.8-200.8) (1.89) |
| Suero | 153.1 (41.8-237.1) | 479.1 ^b (202.3-1633.8) (3.13) | 116.9 (87.8-242.5) (0.76) |

El número en *cursiva* y entre paréntesis es el incremento respecto al valor "T1".

^ap < 0.01, ^bp < 0.001.

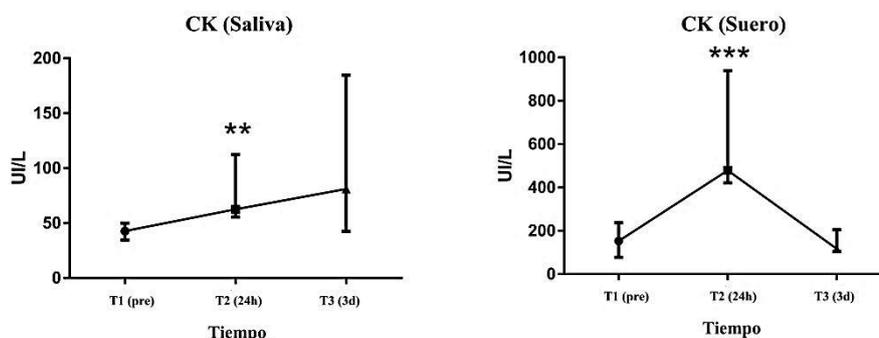


Figura 10. Gráficas de los valores de CK en saliva y suero de perro. Mediana y Desviación Estandar (**p < 0.01; ***p < 0.001)

Tabla 18. Mediana y rango de AST (UI/L) en saliva y suero.

| | T1 (pre) | T2 (24h) | T3 (3d) |
|--------|----------------------|--|---------------------------------|
| Saliva | 90.4 (47.7-135.3) | 250.2 ^a (60.5-391) (2.76) | 142.8 (73.7-361.1) (1.57) |
| Suero | 30.7 (16.7-55.9) | 56.6 ^b (27-133.2) (1.84) | 31.3 (21.3-76.6) (1.01) |

El número en *cursiva* y entre paréntesis es el incremento respecto al valor "T1".

^ap < 0.01, ^bp < 0.001

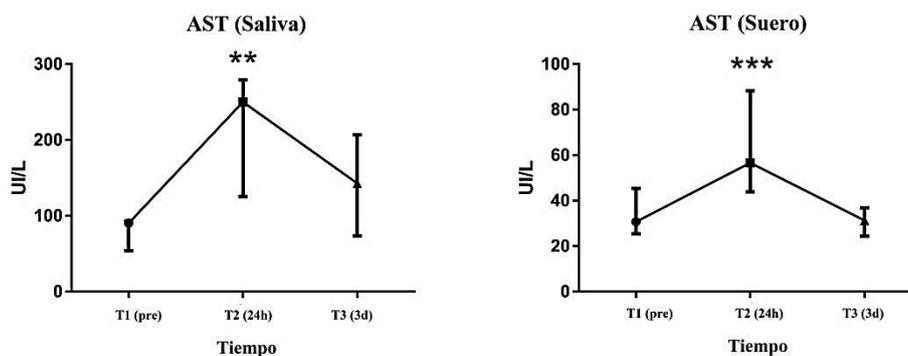


Figura 11. Gráficas de los valores de AST en saliva y suero. Mediana y Desviación Estandar (**p < 0.01; ***p < 0.001)

Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en humanos

En los estudios de validación todas las enzimas mostraron una linealidad con un coeficiente de correlación superior al 0.99 y unas variaciones intra- e inter-ensayo inferiores al 6%. Por último, los límites de detección fueron 2 IU/L para CK, 3 IU/L para AST y 10 IU/L para LDH.

El partido de fútbol sala, con dos partes de 20 minutos y un descanso de 10 minutos, se jugó en el mes de marzo, comenzando a las 19.00 horas y con una temperatura ambiente de 22°C.

La puntuación RPE (mediana) para el partido fue de 7 puntos en la escala. Con el 100% de los sujetos calificando el ejercicio como fuerte y extremadamente fuerte, y muchos jugadores como muy fuerte.

Los participantes en el estudio afirmaron estar completamente sanos y no ser fumadores. No tenían ninguna enfermedad oral o dental evidente. Además, no habían recibido medicación alguna el mes previo al estudio.

Los resultados de los niveles enzimáticos en suero y saliva, antes y después del partido se muestran en las Tablas 19, 20 y 21. Se puede observar un incremento significativo de CK a las 12 y a las 24 horas después del encuentro (el incremento fue mayor cuando los resultados fueron corregidos teniendo en cuenta el flujo salival). También, se observó un incremento significativo de LDH a los 30 minutos, 12 horas y 24 horas después del partido. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los valores de AST en saliva antes y después del encuentro.

Los valores medios de hematocrito fueron 45.5% antes del partido y 44.8%, 44.6% y 45.2% a los 30 minutos, 12 horas y 24 horas después del partido, respectivamente. No se evidenciaron diferencias significativas en el hematocrito entre los diferentes tiempos.

No se observaron correlaciones significativas entre los valores en suero y saliva para cada tiempo y enzima del estudio.

Tabla 19. Mediana y rango de CK (IU/L) en suero, saliva sin corrección y con corrección en base al flujo.

| | Pre | 30 min post | 12 h post | 24 h post |
|--|---------------------|---|---|--|
| Suero | 99 (82-159) | 180 (141-261) ^a (1.82) | 290 (159-620) ^b (2.93) | 219 (121-410) ^a (2.21) |
| Salivación pasiva | 21.0 (7.90-28.6) | 30.0 (20.9-159) (1.42) | 50.6 (10.0-71.8) ^a (2.4) | 38.1 (22.6-87.8) ^a (1.81) |
| Saliva corregida (x10⁻³) | 52 (15-57) | 82 (20-450) (1.57) | 131 (22-204) ^a (2.52) | 122 (58-209) ^a (2.34) |

El número en *cursiva* y entre paréntesis es el incremento respecto al valor "Pre".

^ap < 0.05, ^bp < 0.01

Tabla 20. Mediana y rango de AST (IU/L) en suero, saliva sin corrección y con corrección en base al flujo.

| | Pre | 30 min post | 12 h post | 24 h post |
|--|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Suero | 20.7 (17.3-21.7) | 29.2 (23.2-33.9) ^b | 27.4 (21.6-33.9) ^b | 24.3 (22-35.6) ^b |
| Salivación pasiva | 25.4 (6.4-65.1) | 21.9 (11-70.9) | 41.8 (9.8-77.4) | 42.5 (17.3-67.4) |
| Saliva corregida (x10⁻³) | 46 (12-181) | 39 (11-200) | 63 (22-334) | 109 (50-181) |

^ap < 0.05, ^bp < 0.01

Tabla 21. Mediana y rango de LDH (IU/L) en suero, saliva sin corrección y con corrección en base al flujo.

| | Pre | 30 min post | 12 h post | 24 h post |
|--|-------------------|---|---|---|
| Suero | 289 (227-331) | 418 (381-498) ^b (1.42) | 397 (317-401) ^b (1.37) | 355 (322-433) ^b (1.2) |
| Salivación pasiva | 326 (74.9-496) | 472 (196-816) ^a (1.45) | 453 (108-1335) ^a (1.38) | 432 (179-1215) ^a (1.30) |
| Saliva corregida (x10⁻³) | 866 (143-907) | 1203 (243-1957) (1.39) | 1221 (241-2436) ^a (1.41) | 1212 (320-2485) ^a (1.40) |

El número en *cursiva* y entre paréntesis es el incremento respecto al valor "Pre".

^ap < 0.05, ^bp < 0.01

Discusión

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Discusión

Efecto de diferentes métodos de colección de saliva y su posterior procesado sobre CK, AST y LDH

En nuestro estudio, cuando las muestras se centrifugaron la precisión de los análisis aumentó de forma significativa. Esto puede deberse a que las muestras de saliva contienen restos celulares, moco y/o restos de comida, que pueden interferir con los análisis y aumentar la imprecisión.

Sin embargo, la centrifugación descendió los valores de las enzimas de menor peso molecular, es decir de CK y AST (80 kDa y 90 kDa, respectivamente), pero no afectó a LDH (140 kDa). Esto coincide con otros estudios, en los cuales se observa un descenso de CRP (115 kDa) y mioglobina (16.7 kDa) pero no en IgE (160 kDa) después de la centrifugación de las muestras de saliva (Mohamed *et al.* 2012), aunque la explicación a estos hallazgos no se conoce.

Cuando se usó algodón se detectó un descenso significativo de LDH. El algodón ya ha mostrado interferencias en estudios de varios analitos en saliva humana produciendo un incremento de los niveles de testosterona, dehidroepiandrosterona (DHEA) y/o progesterona (Dabbs 1993; Shirtcliff *et al.* 2001), y descendiendo niveles de CRP y mioglobina (Topkas *et al.* 2012). Se ha postulado la hipótesis de que esto podría deberse a que LDH se adhiere a las fibras de algodón, quedando “secuestrada” y conllevando un descenso en los niveles detectados analíticamente (Shirtcliff *et al.* 2001).

Los valores de las enzimas en los tres tratamientos (“no tratadas”, “centrifugada” y “algodón”), mostraron correlaciones positivas. Y, aunque estos datos podrían indicar que los tres sistemas o procedimientos producen valores comparables, se debería recomendar la centrifugación de las muestras (con o sin el uso de algodón) ya que mejora altamente la precisión de los análisis. En todo caso, una vez se escoge el método de procesado de la muestra de saliva debería realizarse el mismo tratamiento durante todo el estudio para poder comparar los resultados (Mohamed *et al.* 2012); y usar intervalos de referencia específicos según el tratamiento realizado (Topkas *et al.* 2012).

Efecto de diferentes tipos de almacenamiento sobre CK, AST y LDH

Para cada enzima se discutirá en primer lugar el efecto de las diferentes condiciones de conservación sobre su estabilidad. Y posteriormente se tratará el efecto de los ciclos de congelación y descongelación a -20°C y -80°C para los distintos analitos.

En nuestro estudio CK en saliva a temperatura ambiente y bajo condiciones de refrigeración perdió su estabilidad de forma significativa a los 7 días, lo que conlleva que el último punto estable conocido sea a las 24 horas. Esto coincide con un estudio de CK en suero, que describe pérdidas significativas de estabilidad a los 7 días en refrigeración (Cray *et al.* 2009).

Bajo condiciones de congelación a -20°C la muestra perdió su estabilidad de forma significativa a los 3 meses, resultando el primer mes el último tiempo conocido con estabilidad. Sin embargo, a -80°C CK se mantuvo estable durante el año que duró el estudio. Un estudio sobre CK en suero de rata determinó que a -20°C a los 3 meses seguía manteniéndose estable, pero al año ya había perdido la estabilidad con una disminución de más de 59 veces sobre el valor control (Cray *et al.* 2009).

Por último, el efecto de los ciclos de congelación sobre CK afectó significativamente a la estabilidad de la enzima a partir del séptimo ciclo cuando la muestra se congeló a la temperatura de -20°C y, sin embargo, no hubo efecto de los ciclos de congelación y descongelación a -80°C . Esto podría indicar que la estabilidad de la CK depende más de la temperatura de almacenamiento que del número de ciclos de congelación y descongelación. Este comportamiento se ha descrito para otros analitos en saliva como CgA (Escribano *et al.* 2014), α -amilasa (O'Donnell *et al.* 2009) y cortisol (Garde and Hansen 2005).

Con respecto a AST, esta enzima mostró una conservación similar a la CK a temperatura ambiente y bajo condiciones de refrigeración, 6 horas y 1 mes, respectivamente. A una temperatura de -20°C fue estable sólo hasta el mes. A -80°C las muestras fueron estables durante toda la prueba, al igual que en CK. Los resultados a -20°C podrían deberse a la inestabilidad propia de la enzima en saliva, ya que, la AST en suero supera los 3 meses de estabilidad (Cray *et al.* 2009; Cuhadar *et al.* 2012).

En cuanto a los ciclos de congelación-descongelación, en contraposición a lo descrito para CK, parece afectar el hecho de la congelación-descongelación sobre las muestras y la temperatura de congelación, dado que a -20°C se observa una disminución significativa desde el quinto ciclo y, sin embargo, a -80°C desde el octavo.

La LDH a temperatura ambiente pierde la estabilidad a las 24 horas, bajo condiciones de refrigeración a los 7 días, a -20°C a las 24 horas y a -80°C al mes. Estos resultados son similares a los obtenidos en un estudio de estabilidad en saliva para LDH, donde se evidenció un ligero descenso a las 24 horas a temperatura ambiente y un descenso significativo en las concentraciones tras 30 minutos a -20°C y sin embargo, no coinciden con los resultados obtenidos bajo condiciones de refrigeración, puesto que ellos refieren una estabilidad superior a los 3 meses (Alonso de la Peña *et al.* 2004). La llamativa inestabilidad de LDH a -20°C también se observa en suero humano, donde se mantiene estable solo durante semana (Taylor and Sethi 2011). Estos resultados podrían atribuirse a la labilidad de las isoenzimas LDH-4 y LDH-5 a la temperatura de -20°C (Rehak *et al.* 2000; Nagler *et al.* 2001).

Un hallazgo curioso es que LDH parece más estable cuando se somete a ciclos de congelación-descongelación a -80°C que sin estar sometida a estos ciclos. Se deberían hacer trabajos en el futuro para determinar las causas de este hallazgo.

De forma global, para almacenar muestras de saliva en las que se van a medir enzimas en el futuro se recomienda mantenerlas a -80°C . Debe resaltarse la inestabilidad que se produce bajo condiciones de conservación a -20° y que LDH es la enzima menos estable de todas las estudiadas y, también que los ciclos a -80°C no afectan para CK, afectan negativamente para AST y positivamente para LDH.

Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en perro

Los resultados de validación analíticos indicaron que los métodos empleados para medir las enzimas en saliva de perro son precisos y lineales.

Los niveles de CK y AST se incrementaron significativamente después de la cirugía sugiriendo que la ovariectomía por el flanco produjo un daño muscular, hecho similar al que han descrito otros autores (Nevill *et al.* 2010). No obstante, hay que tener en cuenta, y no puede excluirse la posible influencia del sevoflurano (Sevoflo[®], EsteveVeterinaria, Barcelona, España) sobre el incremento de las enzimas. En esta línea, un estudio con perros anestesiados de forma general con halotano evidenció incrementos en CK (Aktas *et al.* 1997). Actualmente, según nuestro conocimiento, no existen estudios de la influencia del sevoflurano sobre los valores de CK en suero. Para AST varios estudios han demostrado que el sevoflurano produce incrementos en los valores enzimáticos, aunque con cierta controversia en los resultados, pues por una parte se ha observado un incremento a las 24 horas volviendo a niveles basales a las 48 horas (Yuan *et al.* 2012) y en otros estudios se describe que los niveles de AST se incrementan significativamente a los 7 días después de la anestesia con sevoflurano (Topal *et al.* 2003). En el caso de LDH, aunque no se evaluó en este estudio, se ha descrito que no hay diferencias significativas entre los valores antes y después de la anestesia con sevoflurano (Topal *et al.* 2003; Yuan *et al.* 2012).

Aunque ambas enzimas mostraron incrementos en suero tras el procedimiento experimental, el incremento de AST fue de menor magnitud si lo comparamos con el incremento de CK, puesto que a las 24 horas CK había aumentado 3.13 veces y AST 1.84 veces respecto al valor inicial o control. Esto apoya la hipótesis de que AST en perros es menos específica que CK para las enfermedades musculares (Chanoit *et al.* 2001). De todos modos, AST se incrementó en suero, de forma similar a un estudio donde se describieron incrementos de AST en sangre de hasta 2 veces el valor del grupo control tras la realización de carreras de perros de alta intensidad (Lucas *et al.* 2015).

Nuestro estudio describe por primera vez la existencia de actividad de CK y AST en saliva de perros. La actividad de CK fue menor en saliva que en suero y, sin embargo,

en el caso de AST la actividad en saliva fue más de 4 veces superior que en suero. Los niveles de CK detectados en saliva suponen aproximadamente el 10% de los niveles encontrados en suero, resultados similares a los observados en otros estudios en humana (Mirzaii-Dizgah and Jafari-Sabet 2011). Por otro lado, diferentes autores han observado en estudios de humana que la actividad de AST en saliva es similar al suero (10-34 UI/L) (Todorovic *et al.* 2006; McPherson and Pincus 2007; Kumar *et al.* 2013; Luke *et al.* 2015). Sería interesante realizar estudios adicionales para determinar las razones que producen los altos valores de AST en saliva en comparación con el suero en perros.

En nuestro estudio se obtuvieron correlaciones significativas entre las actividades de CK y AST en suero y saliva. De forma similar, otro estudio encontró correlaciones significativas ($r = 0.422$ $p < 0.01$) entre la CK en saliva y suero en humanos sometidos a una situación de daño muscular, concretamente de infarto agudo de miocardio (Mirzaii-Dizgah and Jafari-Sabet 2011).

Después del procedimiento quirúrgico ambas enzimas se incrementaron. El mecanismo del incremento de estas enzimas en saliva no se conoce del todo aún. Aunque se ha postulado que los cambios de CK en sangre pueden conducir a un cambio similar, aunque en menor grado, de los niveles de este marcador en saliva (Mirzaii-Dizgah and Jafari-Sabet 2011). Además, podría existir una síntesis de CK en las propias glándulas salivales, puesto que de hecho algunos componentes de la saliva se producen en ellas (Aps and Martens 2005).

Es importante recordar que la actividad de las enzimas depende de muchos factores como la edad, el sexo, la raza, la masa muscular, la actividad física, de las condiciones climáticas (Brancaccio *et al.* 2008) o las enfermedades (Todorovic *et al.* 2006), entre otros. Por tanto pueden encontrarse diferencias en los valores y en las respuestas enzimáticas dependiendo de los factores mencionados, y los valores obtenidos en este estudio no deberían tomarse como valores de referencia.

Estudio de la saliva como alternativa para evaluar el daño muscular en humanos

Al igual que ocurría en el perro, los métodos empleados para medir las diferentes enzimas en saliva fueron precisos y lineales.

Las concentraciones séricas de CK, AST y LDH, han demostrado ser marcadores útiles para la determinación del estado del tejido muscular (Tsubakihara *et al.* 2013). En nuestro estudio, las concentraciones de las tres enzimas en suero se incrementaron significativamente después del partido, lo que sugiere que la intensidad del ejercicio fue lo suficientemente alta como para producir un daño en el tejido muscular. Paralelamente, en la percepción del esfuerzo (RPE) se obtuvo un resultado de 7 (mediana), calificando el ejercicio como “fuerte” y “extremadamente fuerte”, lo que es coincidente con otros estudios en los cuales se ha evaluado el esfuerzo en fútbol sala (Moreira *et al.* 2011). Aunque los jugadores no eran profesionales, el encuentro era la semifinal de una liga, lo que lleva asociado un gran nivel de competitividad, y que puede explicar los altos valores de RPE que se corresponderían con un esfuerzo de alta intensidad. El fútbol sala es un deporte que conlleva un ejercicio intenso. Este deporte induce fuertes contracciones del tejido muscular e implica la posibilidad de golpes o colisiones entre los jugadores, factores que pueden llevar a dañar el músculo y a producir daño muscular.

La magnitud de aumento de CK en suero en nuestro estudio fue de 1.82 veces a los 30 minutos después del partido, incremento que fue ligeramente inferior al observado en otro estudio (incremento de 2.5) en un partido de fútbol (de Moura *et al.* 2012). Estas diferencias podrían ser debidas a la intensidad de juego o al número de colisiones o golpes entre jugadores. La intensidad del esfuerzo y sobre todo la tasa metabólica pueden variar entre diferentes niveles de competición (Alvarez *et al.* 2009; Makaje *et al.* 2012) e incluso según el país en el que se juegue, por ejemplo los jugadores de fútbol sala de elite australianos juegan menos tiempo y recorren menores distancias que los jugadores de fútbol sala españoles (Dogramaci *et al.* 2011). Por otro lado, la hemoconcentración debida a la pérdida de líquido puede influenciar

los valores enzimáticos, aunque en nuestro estudio, basándonos en el valor hematocrito de los participantes, no se dio tal hemoconcentración.

En general, encontramos una baja correlación entre los valores plasmáticos y la saliva. De forma similar se han descrito este tipo de hallazgos para otros analitos como en el caso del péptido natriurético cerebral N-terminal (NT-ProBNP) (Foo *et al.* 2012). Esta baja correlación podría explicarse por un retraso en el paso de las enzimas de la sangre a la saliva. Esta hipótesis se apoyaría en que existe una alta correlación en los valores obtenidos de forma previa al partido, en comparación a la correlación obtenida con todos los valores. Además, en el caso de CK la concentración en saliva fue menor que en suero, como se ha descrito en otros estudios (Mirzaii-Dizgah and Jafari-Sabet 2011), lo que podría llevar a pensar en la existencia de un límite para el paso de CK desde el plasma a la saliva, como ha sido postulado para otros analitos como NT-ProBNP que también mostró concentraciones menores en saliva con respecto a las mostradas en suero (Foo *et al.* 2012).

Por otra parte, se sabe que la forma de expresar los resultados de los analitos en saliva, aplicando o no una corrección en base al flujo salival, puede resultar en importantes variaciones. En nuestro estudio cuando los resultados obtenidos se han corregido considerando el flujo salival se han observado mayores incrementos en CK después del ejercicio. Y es que, es de destacar que existe un debate sobre cuál es la mejor forma de expresar los cambios de los analitos salivales y especialmente los debidos al ejercicio físico donde el estado de hidratación o el incremento de la actividad simpática pueden influenciar el flujo salival y por tanto la cantidad de saliva secretada (Moreira *et al.* 2011). Por ejemplo, en el caso de una disminución de la secreción, la consecuente concentración podría resultar en un aparente incremento de las concentraciones de los analitos en saliva; y por el contrario, un incremento en la salivación podría tener un efecto de dilución. Por ello, una solución a estos problemas es expresar las concentraciones corregidas en base al flujo salival, lo que en algunos estudios se denomina ratio de secreción de un determinado analito, del inglés “*secretion rate*” (Bishop and Gleeson 2009; Moreira *et al.* 2011).

Además de la baja correlación hallada entre las enzimas séricas y salivales, existen algunos factores que podrían limitar el uso de las enzimas en saliva para monitorizar el

estatus muscular. Uno de ellos podría ser la elevada desviación estándar que se muestra en los valores del estudio, lo cual refleja una gran variabilidad en los valores enzimáticos entre individuos. Y es que los valores de las enzimas musculares dependen en un grado bastante alto del individuo, con grandes variaciones entre atletas incluso de un mismo equipo, por lo que se recomienda realizar seguimientos individualizados (Proia *et al.* 2012; Thorpe and Sunderland 2012).

Existen también otras causas que pueden variar los valores de las enzimas estudiadas y, por tanto, disminuir su especificidad, por ejemplo la CK total y CK-MB aumentan en la saliva de pacientes con infarto de miocardio (Mirzaii-Dizgah *et al.* 2011; Mirzaii-Dizgah and Jafari-Sabet 2011). Sin embargo, se ha demostrado que los modelos de ejercicio intermitente como las sesiones de entrenamiento o los partidos de fútbol sala conllevan cambios muy pequeños sobre los marcadores séricos de daño cardíaco, con una limitada evidencia de lesión sobre los miocitos (Carranza-García *et al.* 2011). Basándonos en esto último un incremento de CK en saliva en reposo y no asociado con ejercicio físico podría sugerir un riesgo de padecer un infarto de miocardio. También es importante señalar que CK, AST y LDH pueden aumentar en saliva ante enfermedades periodontales, por ejemplo AST puede incrementarse hasta 5 veces (Totán *et al.* 2006; Todorovic *et al.* 2006) y en el caso concreto de LDH se han descrito aumentos también por cáncer oral (Shetty *et al.* 2012). De esta forma, en estos casos u otros en los que se pudiesen generar aumentos de estas enzimas en suero, la interpretación de las mismas, como indicadores de daño muscular, debe hacerse con precaución.

Conclusiones

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Conclusiones

1. La centrifugación de las muestras de saliva mejora altamente la precisión de los análisis.
2. El método de conservación de muestras de saliva que infiere mayor estabilidad a largo plazo en CK, AST y LDH es a -80°C . En estas condiciones se pueden realizar hasta 8 ciclos de congelación-descongelación sin afectar a la estabilidad enzimática de CK y LDH (AST hasta 7).
3. CK y AST se incrementan significativamente en saliva de perro después de un procedimiento quirúrgico que implica daño muscular. Además los valores de CK y AST en saliva de perro muestran una correlación significativa con los valores séricos.

4. El ejercicio de alta intensidad conlleva un incremento en las concentraciones de CK y LDH en saliva humana. En el caso de los resultados obtenidos para CK en saliva humana, se observan mayores incrementos cuando se corrigen considerando el flujo salival. Este hecho debe tenerse en cuenta y subraya la importancia de estandarizar las condiciones de muestreo y expresión de los resultados para estas enzimas en saliva.
5. Existe un alto potencial clínico a desarrollar en la medición de enzimas en saliva, que podría emplearse para evaluar el stress y/o el daño muscular permitiendo la monitorización del estatus muscular, de una manera fácil y no invasiva.

Resumen

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Resumen

El uso de la saliva como medio diagnóstico es cada vez más frecuente. De hecho, se ha podido constatar dicha utilidad en la detección de diversas sustancias, así como en el diagnóstico de algunas enfermedades. Por su parte, el daño muscular conlleva el incremento en sangre de ciertas enzimas, como CK, AST y LDH.

El objetivo de la presente tesis doctoral es comprobar que la saliva puede usarse para detectar el daño muscular. Y de forma paralela evaluar cómo afectan diferentes condiciones de colección, procesado y almacenamiento de muestras de saliva sobre las enzimas de daño muscular.

Para llevar a cabo tal objetivo se plantearon 4 estudios relacionados entre sí.

En el primero de ellos se analizaron las variaciones enzimáticas que había entre las muestras de saliva sin tratar, las centrifugadas y las centrifugadas con algodón; a su

vez se estudiaron diferentes métodos de centrifugación, con diferentes tiempos y fuerzas.

En el segundo estudio, se analizaron las variaciones enzimáticas que había en las muestras de saliva al someterlas a diferentes condiciones de almacenamiento en el tiempo: a temperatura ambiente, refrigeración, a -20°C y a -80°C . Por otro lado, también se evaluó la estabilidad enzimática tras varios ciclos de congelación y descongelación a -20°C y a -80°C .

En el tercer lugar, se recurrió a un modelo animal de daño muscular, ovariectomía por el flanco en perro, en el que se midieron los valores de las enzimas CK y AST en suero y saliva, antes y después de la cirugía.

Por último, el cuarto estudio midió los valores enzimáticos de CK, AST y LDH en jugadores de fútbol sala, antes y después (varios tiempos) del partido, en suero y en saliva.

Tras el análisis de los resultados se llegó a las siguientes conclusiones. En el primer estudio se llegó a la conclusión de que la centrifugación de las muestras de saliva mejora altamente la precisión de los análisis. En el segundo a que el método de conservación más apropiado es a -80°C . Finalmente, el tercer y cuarto estudios ponen de manifiesto que las enzimas estudiadas se incrementan tras un evento que implica un daño muscular.

En definitiva, la saliva se configura como un buen medio diagnóstico para el daño muscular, con gran potencial clínico a desarrollar.

Summary

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Summary

The use of saliva as a diagnostic medium is increasing during last years. In fact it has been possible to verify this utility in the detection of various substances and in the diagnosis of some diseases. On the other hand, muscle damage increases blood levels of certain enzymes such as CK, AST and LDH.

The aim of this Thesis was to know if saliva could be used to detect muscle damage. And also, evaluate how the different conditions of collection, processing and storage of saliva samples affect to the studied enzymes.

To achieve this objective 4 studies were performed in saliva.

In the first study the enzymatic variations between the saliva untreated samples, the centrifuged samples and the centrifuged samples with cotton were analyzed and, also different methods of centrifugation were studied with different times and forces.

In the second study the stability of the studied enzymes under different storage conditions were analyzed. Concretely at room temperature, under refrigeration, at -20°C and -80°C . On the other hand the enzymatic stability was evaluated after several cycles of freezing and thawing at -20°C and at -80°C .

In the third study CK and AST enzymes were measured in serum and saliva before and after an ovariohysterectomy.

Finally, in the fourth study CK AST and LDH were measured in serum and in saliva in soccer players before and after the match

After the analysis of the results the following conclusions were (1) the centrifugation of the saliva samples improves highly the precision of the analysis, (2) the best conservation method is at -80°C . Finally, the third and the fourth studies shown that the enzymes studied increased after an event involving muscle damage.

In conclusion saliva is configured as a good diagnostic medium for muscle damage with great clinical potential to be developed.

Bibliografía

Estudio de marcadores de daño muscular en saliva humana y de perro: un caso de *one health*.

Bibliografía

- Adişen E, Aral A, Aybay C, Gürer MA (2008) Salivary epidermal growth factor levels in Behçet's disease and recurrent aphthous stomatitis. *Dermatol Basel Switz* 217:235–240. doi: 10.1159/000148250
- Aktas BM, Vinclair P, Autefage A, Lefebvre HP, Toutain PL, Braun JP (1997) In vivo quantification of muscle damage in dogs after general anaesthesia with halothane and propofol. *J Small Anim Pract* 38:565–569.
- Alonso de la Peña V, Diz Dios P, Lojo Rocamonde S, Tojo Sierra R, Rodríguez-Segade S (2004) A standardised protocol for the quantification of lactate dehydrogenase activity in saliva. *Arch Oral Biol* 49:23–27. doi: 10.1016/S0003-9969(03)00196-1
- Alonso De La Peña V, Diz Dios P, Tojo Sierra R (2007) Relationship between lactate dehydrogenase activity in saliva and oral health status. *Arch Oral Biol* 52:911–915. doi: 10.1016/j.archoralbio.2007.04.008

- Alvarez JCB, D'Ottavio S, Vera JG, Castagna C (2009) Aerobic fitness in futsal players of different competitive level. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 23:2163–2166. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181b7f8ad
- American Veterinary Medical Association (2008) One Health : A New Professional Imperative. <http://docplayer.net/83975-One-health-a-new-professional-imperative.html>. Accessed 2 May 2016
- Aps JKM, Martens LC (2005) Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 150:119–131. doi: 10.1016/j.forsciint.2004.10.026
- Bast RC, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K (2005) New tumor markers: CA125 and beyond. *Int J Gynecol Cancer Off J Int Gynecol Cancer Soc* 15 Suppl 3:274–281. doi: 10.1111/j.1525-1438.2005.00441.x
- Bell RD, Rosenberg RN, Ting R, Mukherjee A, Stone MJ, Willerson JT (1978) Creatine kinase BB isoenzyme levels by radioimmunoassay in patients with neurological disease. *Ann Neurol* 3:52–59. doi: 10.1002/ana.410030108
- Bhagavan NV, Darm JR, Scottolini AG (1982) A sixth lactate dehydrogenase isoenzyme (LD6) and its significance. *Arch Pathol Lab Med* 106:521–523.
- Bijsterbosch MK, Duursma AM, Smit MJ, Bos OJ, Bouma JM, Gruber M (1985) Several dehydrogenases and kinases compete for endocytosis from plasma by rat tissues. *Biochem J* 229:409–417.
- Bird SR, Linden M, Hawley JA (2014) Acute changes to biomarkers as a consequence of prolonged strenuous running. *Ann Clin Biochem Int J Biochem Lab Med* 51:137–150. doi: 10.1177/0004563213492147
- Bishop NC, Gleeson M (2009) Acute and chronic effects of exercise on markers of mucosal immunity. *Front Biosci Landmark Ed* 14:4444–4456.
- Blicharz TM, Rissin DM, Bowden M, Hayman RB, DiCesare C, Bhatia JS, Grand-Pierre N, Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Loscalzo J, Oppenheim FG, Walt DR (2008) Use of colorimetric test strips for monitoring the effect of hemodialysis on salivary nitrite and uric acid in patients with end-stage renal disease: a proof of principle. *Clin Chem* 54:1473–1480. doi: 10.1373/clinchem.2008.105320
- Boghorci M, Aghamaali M, Sariri R, Mohamadpour F, Ghafouri H (2014) Salivary enzymes and flow rate: Markers of peptic ulcer. *J Oral Biol Craniofacial Res* 4:24–29. doi: 10.1016/j.jobcr.2013.12.001
- Borg G, Ljunggren G, Ceci R (1985) The increase of perceived exertion, aches and pain in the legs, heart rate and blood lactate during exercise on a bicycle ergometer. *Eur J Appl Physiol* 54:343–349.

- Borrayo-Sánchez G, Sosa-Jarero F, Borja-Terán B, Isordia-Salas I, Argüero-Sánchez R (2006) [Qualitative determination of markers for myocardial necrosis during pre-hospital admission for acute coronary syndrome]. *Cir Cir* 74:231–235.
- Bosch X, Poch E, Grau JM (2009) Rhabdomyolysis and Acute Kidney Injury. *N Engl J Med* 361:62–72. doi: 10.1056/NEJMra0801327
- Bosker WM, Huestis MA (2009) Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem* 55:1910–1931. doi: 10.1373/clinchem.2008.108670
- Brancaccio P, Maffulli N, Buonauro R, Limongelli FM (2008) Serum enzyme monitoring in sports medicine. *Clin Sports Med* 27:1–18, vii. doi: 10.1016/j.csm.2007.09.005
- Brandtzaeg P (2007) Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci* 1098:288–311. doi: 10.1196/annals.1384.012
- Cabello B, Lubin J, Rywlin AM, Frenkel R (1980) Significance of a sixth lactate dehydrogenase isoenzyme (LDH6). *Am J Clin Pathol* 73:253–258.
- Carranza-García LE, George K, Serrano-Ostáriz E, Casado-Arroyo R, Caballero-Navarro AL, Legaz-Arrese A (2011) Cardiac biomarker response to intermittent exercise bouts. *Int J Sports Med* 32:327–331. doi: 10.1055/s-0030-1263138
- Cesco R de T, Ito IY, de Albuquerque RF (2003) Levels of aspartate aminotransferase (AST) in saliva of patients with different periodontal conditions. *J Clin Periodontol* 30:752–755.
- Chahin N, Selcen D, Engel AG (2005) Sporadic late onset nemaline myopathy. *Neurology* 65:1158–1164. doi: 10.1212/01.wnl.0000180362.90078.dc
- Chanoit GP, Lefebvre HP, Orcel K, Laroute V, Toutain PL, Braun JP (2001) Use of plasma creatine kinase pharmacokinetics to estimate the amount of exercise-induced muscle damage in Beagles. *Am J Vet Res* 62:1375–1380.
- Chariot P, Bignani O (2003) Skeletal muscle disorders associated with selenium deficiency in humans. *Muscle Nerve* 27:662–668. doi: 10.1002/mus.10304
- Christodoulides N, Floriano PN, Miller CS, Ebersole JL, Mohanty S, Dharshan P, Griffin M, Lennart A, Ballard KLM, King CP, Langub MC, Kryscio RJ, Thomas MV, McDevitt JT (2007) Lab-on-a-chip methods for point-of-care measurements of salivary biomarkers of periodontitis. *Ann N Y Acad Sci* 1098:411–428. doi: 10.1196/annals.1384.035
- Chuang CK, Ng KF, Liao SK (2000) Adult Wilms' tumor presenting as acute abdomen with elevated serum lactate dehydrogenase-4 and -5 isoenzymes: case report. *Chang Gung Med J* 23:235–239.

- Cray C, Rodriguez M, Zaias J, Altman NH (2009) Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS* 48:202–204.
- Cuhadar S, Atay A, Koseoglu M, Dirican A, Hur A (2012) Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions. *Biochem Medica* 22:202–214.
- Dabbs JM (1993) Salivary testosterone measurements in behavioral studies. *Ann N Y Acad Sci* 694:177–183.
- Daher EDF, Júnior S, Da GB, Brunetta DM, Pontes LB, Bezerra GP (2005) Rhabdomyolysis and acute renal failure after strenuous exercise and alcohol abuse: case report and literature review. *Sao Paulo Med J* 123:33–37. doi: 10.1590/S1516-31802005000100008
- Dawes C (1993) Considerations in the development of diagnostic tests on saliva. *Ann N Y Acad Sci* 694:265–269.
- Dawes C (1974) Rhythms in salivary flow rate and composition. *Int J Chronobiol* 2:253–279.
- de Moura NR, Cury-Boaventura MF, Santos VC, Levada-Pires AC, Bortolon J, Fiamoncini J, Pithon-Curi TC, Curi R, Hatanaka E (2012) Inflammatory response and neutrophil functions in players after a futsal match. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 26:2507–2514. doi: 10.1519/JSC.0b013e31823f29b5
- Delporte C, Steinfeld S (2006) Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta* 1758:1061–1070. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.01.022
- Denny PC, Denny PA, Klauser DK, Hong SH, Navazesh M, Tabak LA (1991) Age-related changes in mucins from human whole saliva. *J Dent Res* 70:1320–1327.
- Dias Fernandes CS, Salum FG, Bandeira D, Pawlowski J, Luz C, Cherubini K (2009) Salivary dehydroepiandrosterone (DHEA) levels in patients with the complaint of burning mouth: a case-control study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:537–543. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.06.022
- Dogramaci SN, Watsford ML, Murphy AJ (2011) Time-motion analysis of international and national level futsal. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 25:646–651. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181c6a02e
- Drummer OH (2006) Drug testing in oral fluid. *Clin Biochem Rev Aust Assoc Clin Biochem* 27:147–159.
- Eckley CA, Rios L da S, Rizzo LV (2007) Salivary egf concentration in adults with reflux chronic laryngitis before and after treatment: preliminary results. *Braz J Otorhinolaryngol* 73:156–160.

- Edgar WM (1992) Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 172:305–312.
- Edgar WM (1990) Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J* 169:96–98.
- El-Bohy AA, Wong BL (2005) The diagnosis of muscular dystrophy. *Pediatr Ann* 34:525–530.
- Emekli-Alturfan E, Kasikci E, Alturfan AA, Pisiriciler R, Yarat A (2009) Effect of sample storage on stability of salivary glutathione, lipid peroxidation levels, and tissue factor activity. *J Clin Lab Anal* 23:93–98. doi: 10.1002/jcla.20296
- Emekli-Alturfan E, Yarat A, Çalışkan-Ak E, Pisiriciler R, Kuru B, Noyan Ü (2013) Determination of storage time of saliva samples obtained from patients with and without chronic periodontitis for the comparison of some biochemical and cytological parameters. *J Clin Lab Anal* 27:261–266. doi: 10.1002/jcla.21592
- Epstein Y (1995) Clinical significance of serum creatine phosphokinase activity levels following exercise. *Isr J Med Sci* 31:698–699.
- Escribano D, Gutiérrez AM, Fuentes-Rubio M, Cerón JJ (2014) Saliva chromogranin A in growing pigs: a study of circadian patterns during daytime and stability under different storage conditions. *Vet J Lond Engl* 199:355–359. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.01.005
- Farber NM, Perez-Lloret S, Gamzu ER (2015) Design and development of a novel supportive care product for the treatment of sialorrhea in Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem* 15:939–954.
- Fernández-Tresguerres Hernández JA, Ariznavarreta Ruiz C, Alfaro González V (2010) *Fisiología humana*. : McGraw-Hill-Interamericana, México, D.F
- Foo JYY, Wan Y, Kostner K, Arivalagan A, Atherton J, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C (2012) NT-ProBNP Levels in Saliva and Its Clinical Relevance to Heart Failure. *PLOS ONE* 7:e48452. doi: 10.1371/journal.pone.0048452
- Galla JM, Mahaffey KW, Sapp SK, Alexander JH, Roe MT, Ohman EM, Granger CB, Armstrong PW, Harrington RA, White HD, Simoons ML, Newby LK, Califf RM, Topol EJ (2006) Elevated creatine kinase-MB with normal creatine kinase predicts worse outcomes in patients with acute coronary syndromes: results from 4 large clinical trials. *Am Heart J* 151:16–24. doi: 10.1016/j.ahj.2005.01.045
- García-Tamez SE, Echegoyen-Monroy S, Ybarra-Barrera P, Rodríguez MC (2012) [Epidemiology of injuries in a male college indoor soccer team]. *Acta Ortopédica Mex* 26:219–223.

- Garde AH, Hansen AM (2005) Long-term stability of salivary cortisol. *Scand J Clin Lab Invest* 65:433–436. doi: 10.1080/00365510510025773
- Gavrilova N, Lindau ST (2009) Salivary sex hormone measurement in a national, population-based study of older adults. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 64 Suppl 1:i94-105. doi: 10.1093/geronb/gbn028
- Górecka A (1975) [Lactic dehydrogenase isoenzymes (LDH) in the serum of patients with progressive muscular dystrophy]. *Neurol Neurochir Pol* 9:7–13.
- Gray SH, Ebe LK, Feldman HA, Emans SJ, Osganian SK, Gordon CM, Laufer MR (2010) Salivary progesterone levels before menarche: a prospective study of adolescent girls. *J Clin Endocrinol Metab* 95:3507–3511. doi: 10.1210/jc.2010-0125
- Gröschl M, Wagner R, Rauh M, Dörr HG (2001) Stability of salivary steroids: the influences of storage, food and dental care. *Steroids* 66:737–741.
- Gutiérrez AM, Escribano D, Fuentes M, Cerón JJ (2013) Circadian pattern of acute phase proteins in the saliva of growing pigs. *Vet J* 196:167–170. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.003
- Hall JE, Guyton AC (2011) *Tratado de fisiología médica: Guyton & Hall*. Elsevier, Barcelona [etc.
- Hamilton LD, van Anders SM, Cox DN, Watson NV (2009) The effect of competition on salivary testosterone in elite female athletes. *Int J Sports Physiol Perform* 4:538–542.
- Hina K, Kusachi S, Iwasaki K, Takaishi A, Yamamoto K, Tominaga Y, Kita T, Tsuji T (1997) Use of serum creatine kinase MM isoforms for predicting the progression of left ventricular dilation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Jpn Circ J* 61:315–322.
- Hoffman EP, Clemens PR (1996) HyperCKemic, proximal muscular dystrophies and the dystrophin membrane cytoskeleton, including dystrophinopathies, sarcoglycanopathies, and merosinopathies. *Curr Opin Rheumatol* 8:528–538.
- Hooshmand H (1975) Serum lactate dehydrogenase isoenzymes in neuromuscular diseases. *Dis Nerv Syst* 36:607–611.
- Hornemann T, Stolz M, Wallimann T (2000) Isoenzyme-Specific Interaction of Muscle-Type Creatine Kinase with the Sarcomeric M-Line Is Mediated by Nh2-Terminal Lysine Charge-Clamps. *J Cell Biol* 149:1225–1234.
- Howe LM (2006) Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 66:500–509. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.04.005

- Humphrey SP, Williamson RT (2001) A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85:162–169. doi: 10.1067/mpr.2001.113778
- Ibrahim GA, Zweber BA, Awad EA (1981) Muscle and serum enzymes and isoenzymes in muscular dystrophies. *Arch Phys Med Rehabil* 62:265–269.
- Ide M, Tajima F, Furusawa K, Mizushima T, Ogata H (1999) Wheelchair marathon racing causes striated muscle distress in individuals with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 80:324–327.
- Ihedioha U, Sinha S, Campbell AC (2005) Do creatine kinase (CK) levels influence the diagnosis or outcome in patients with compartment syndrome? *Scott Med J* 50:158–159.
- Iżicka J, Stelmasiak Z (2003) Creatine kinase activity in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Neurol Sci Off J Ital Neurol Soc Ital Soc Clin Neurophysiol* 24:286–287. doi: 10.1007/s10072-003-0158-3
- Jaedicke KM, Taylor JJ, Preshaw PM (2012) Validation and quality control of ELISAs for the use with human saliva samples. *J Immunol Methods* 377:62–65. doi: 10.1016/j.jim.2012.01.010
- Klein BG (2014) Cunningham, Fisiología veterinaria, 13th edn. Elsevier España SA
- Kloss R, Keller HE, Stober T, Emde H, Schimrigk K (1985) [Creatine kinase BB activity in the serum of patients with cerebrovascular diseases]. *Nervenarzt* 56:417–422.
- Kobayashi Y, Takeuchi T, Hosoi T, Yoshizaki H, Loeppky JA (2005) Effect of a marathon run on serum lipoproteins, creatine kinase, and lactate dehydrogenase in recreational runners. *Res Q Exerc Sport* 76:450–455. doi: 10.1080/02701367.2005.10599318
- König HE, Liebich H-G (2005) Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color. Ed. Médica Panamericana
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Tumour and Angiogenesis Research Group (2003) Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 24:199–202. doi: 74430
- Kumar S, Amarapurkar A, Amarapurkar D (2013) Serum aminotransferase levels in healthy population from western India. *Indian J Med Res* 138:894–899.
- Kunutsor SK, Abbasi A, Apekey TA (2014) Aspartate Aminotransferase – Risk Marker for Type-2 Diabetes Mellitus or Red Herring? *Front Endocrinol*. doi: 10.3389/fendo.2014.00189

- Lac G (2001) Saliva assays in clinical and research biology. *Pathol Biol (Paris)* 49:660–667.
- Laflamme D P (1997) Development and validation of a body condition score system for dogs. *22:10–15*.
- Langel K, Engblom C, Pehrsson A, Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P (2008) Drug testing in oral fluid-evaluation of sample collection devices. *J Anal Toxicol* 32:393–401.
- Langman LJ (2007) The use of oral fluid for therapeutic drug management: clinical and forensic toxicology. *Ann N Y Acad Sci* 1098:145–166. doi: 10.1196/annals.1384.001
- Lawrence HP (2002) Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 68:170–174.
- Lippi G, Schena F, Montagnana M, Salvagno GL, Banfi G, Guidi GC (2011) Significant variation of traditional markers of liver injury after a half-marathon run. *Eur J Intern Med* 22:e36–e38. doi: 10.1016/j.ejim.2011.02.007
- Lucas V, Barrera R, Duque FJ, Ruiz P, Zaragoza C (2015) Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds. *Am J Vet Res* 76:637–643. doi: 10.2460/ajvr.76.7.637
- Lukacs JR, Largaespada LL (2006) Explaining sex differences in dental caries prevalence: saliva, hormones, and “life-history” etiologies. *Am J Hum Biol Off J Hum Biol Counc* 18:540–555. doi: 10.1002/ajhb.20530
- Luke R, Khan SN, Iqbal PS, Soman RR, Chakkarayan J, Krishnan V (2015) Estimation of Specific Salivary Enzymatic Biomarkers in Individuals with Gingivitis and Chronic Periodontitis: A Clinical and Biochemical Study. *J Int Oral Health JIOH* 7:54–57.
- Makaje N, Ruangthai R, Arkarapanthu A, Yoopat P (2012) Physiological demands and activity profiles during futsal match play according to competitive level. *J Sports Med Phys Fitness* 52:366–374.
- Malamud D, Rodriguez-Chavez IR (2011) Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am* 55:159–178. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.004
- Mandel ID (1993) Salivary diagnosis: promises, promises. *Ann N Y Acad Sci* 694:1–10.
- Manolopoulou J, Gerum S, Mulatero P, Rossignol P, Plouin P-F, Reincke M, Bidlingmaier M (2010) Salivary aldosterone as a diagnostic aid in primary aldosteronism. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme* 42:400–405. doi: 10.1055/s-0030-1248287
- McPherson RA, Pincus MR (2007) *Henry’s Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. Saunders Elsevier

- Mena P, Maynar M, Campillo JE (1996) Changes in plasma enzyme activities in professional racing cyclists. *Br J Sports Med* 30:122–124.
- Mese H, Matsuo R (2007) Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil* 34:711–723. doi: 10.1111/j.1365-2842.2007.01794.x
- Mirzaii-Dizgah I, Hejazi SF, Riahi E, Salehi MM (2011) Saliva-based creatine kinase MB measurement as a potential point-of-care testing for detection of myocardial infarction. *Clin Oral Investig* 16:775–779. doi: 10.1007/s00784-011-0578-z
- Mirzaii-Dizgah I, Jafari-Sabet M (2011) Unstimulated whole saliva creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Oral Dis* 17:597–600. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01817.x
- Mohamed R, Campbell J-L, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C (2012) The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clin Transl Med* 1:19. doi: 10.1186/2001-1326-1-19
- Mokuno K, Riku S, Sugimura K, Takahashi A, Kato K, Osugi S (1987) Serum creatine kinase isoenzymes in Duchenne muscular dystrophy determined by sensitive enzyme immunoassay methods. *Muscle Nerve* 10:459–463. doi: 10.1002/mus.880100513
- Montero Pérez FJ, Muñoz Avila J, Berlango Jiménez A, Durán Serantes M, Calderón de la Barca Vázquez JM, Jiménez Murillo L, Torres Murillo J (1996) [Increase of blood levels of creatine kinase following intramuscular injection]. *Med Clínica* 107:649–654.
- Moreira A, Arsati F, de Oliveira Lima-Arsati YB, de Freitas CG, de Araújo VC (2011) Salivary immunoglobulin A responses in professional top-level futsal players. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 25:1932–1936. doi: 10.1519/JSC.0b013e3181e7fbc0
- Mueller C, Müller B, Perruchoud AP (2008) Biomarkers: past, present, and future. *Swiss Med Wkly* 138:225–229. doi: 2008/15/smw-12180
- Nagler RM, Lischinsky S, Diamond E, Klein I, Reznick AZ (2001) New insights into salivary lactate dehydrogenase of human subjects. *J Lab Clin Med* 137:363–369. doi: 10.1067/mlc.2001.114710
- Nam J-W, Chung J-W, Kho H-S, Chung S-C, Kim Y-K (2007) Nerve growth factor concentration in human saliva. *Oral Dis* 13:187–192. doi: 10.1111/j.1601-0825.2006.01265.x
- Nevill B, Leisewitz A, Goddard A, Thompson P (2010) An evaluation of changes over time in serum creatine kinase activity and C-reactive protein concentration in dogs undergoing hemilaminectomy or ovariohysterectomy. *J S Afr Vet Assoc* 81:22–26.

- Ng V, Koh D, Fu Q, Chia S-E (2003) Effects of storage time on stability of salivary immunoglobulin A and lysozyme. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 338:131–134.
- Nigro G, Comi LI, Limongelli FM, Giugliano MA, Politano L, Petretta V, Passamano L, Stefanelli S (1983) Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. *Muscle Nerve* 6:253–262. doi: 10.1002/mus.880060403
- Noakes TD (1987) Effect of exercise on serum enzyme activities in humans. *Sports Med Auckl NZ* 4:245–267.
- Nosaka K, Clarkson PM, Apple FS (1992) Time course of serum protein changes after strenuous exercise of the forearm flexors. *J Lab Clin Med* 119:183–188.
- O'Donnell K, Kammerer M, O'Reilly R, Taylor A, Glover V (2009) Salivary alpha-amylase stability, diurnal profile and lack of response to the cold hand test in young women. *Stress Amst Neth* 12:549–554. doi: 10.3109/10253890902822664
- Ohno H, Taniguchi N, Terayama K, Hirata F, Kawarabayashi T (1982) Effect of pyridoxal 5'-phosphate on the activity of aspartate aminotransferase isoenzyme in human plasma after physical exercise. *Ind Health* 20:161–166.
- Ohno H, Watanabe H, Kishihara C, Taniguchi N, Takakuwa E (1978) Effect of physical exercise on the activity of GOT isozyme in human plasma. *Tohoku J Exp Med* 126:371–376.
- Ozmeric N (2004) Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 343:1–16. doi: 10.1016/j.cccn.2004.01.022
- Parisi MR, Soldini L, Di Perri G, Tiberi S, Lazzarin A, Lillo FB (2009) Offer of rapid testing and alternative biological samples as practical tools to implement HIV screening programs. *New Microbiol* 32:391–396.
- Parra MD, Tecles F, Subiela SM, Ceron JJ (2005) C-Reactive Protein Measurement in Canine Saliva. *J Vet Diagn Invest* 17:139–144. doi: 10.1177/104063870501700207
- Pfeiffer FE, Homburger HA, Yanagihara T (1983) Creatine kinase BB isoenzyme in CSF in neurologic diseases. Measurement by radioimmunoassay. *Arch Neurol* 40:169–172.
- Priest JB, Oei TO, Moorehead WR (1982) Exercise-induced changes in common laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 77:285–289.
- Proia P, Bianco A, Schiera G, Saladino P, Pomara F, Petrucci M, Traina M, Palma A (2012) The effects of a 3-week training on basal biomarkers in professional soccer players during the preseason preparation period. *J Sports Med Phys Fitness* 52:102–106.
- Puleo PR, Roberts R (1988) An update on cardiac enzymes. *Cardiol Clin* 6:97–109.

- Qie M, Peng Z, Cao Z, Tang Q, He B (1996) [The value of CA125 and LDH assays in assisting diagnosis of epithelial ovarian carcinoma]. *Hua Xi Yi Ke Xue Xue Bao J West China Univ Med Sci Huaxi Yike Daxue Xuebao Bian Ji Zhe Hua Xi Yi Ke Xue Xue Bao Bian Wei Hui* 27:310–313.
- Rajappa M, Sharma A (2005) Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology* 56:677–691.
- Reece WO (2015) *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons
- Rehak NN, Cecco SA, Csako G (2000) Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC* 38:335–343. doi: 10.1515/CCLM.2000.049
- Rivera-Coll A, Fuentes-Arderiu X, Díez-Noguera A (1993) Circadian rhythms of serum concentrations of 12 enzymes of clinical interest. *Chronobiol Int* 10:190–200.
- Roescher N, Tak PP, Illei GG (2009) Cytokines in Sjögren’s syndrome. *Oral Dis* 15:519–526. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01582.x
- Ruggeri P, Valenti A, Fimiani V (1998) Effects of in vitro polyamine treatment on LDH isoenzyme patterns in Yoshida sarcoma cells and in former macrophages. *Oncol Rep* 5:131–134.
- Sanchez Navarro MR, Wangenstein Fuentes R, Oliver Almedros C (1998) [Serum creatine kinase MM isoforms and lactate dehydrogenase isoenzymes in patients with non-traumatic acute rhabdomyolysis]. *An Med Interna Madr Spain* 1984 15:13–17.
- Shetty SR, Chadha R, Babu S, Kumari S, Bhat S, Achalli S (2012) Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinicopathological study. *J Cancer Res Ther* 8 Suppl 1:S123-125. doi: 10.4103/0973-1482.92226
- Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ (2001) Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 26:165–173.
- Short, SG, Clements, SD (1993) What to know about cardiac isoenzymes: An update. 11 19:55–64.
- Soeder G, Golf SW, Graef V, Temme H, Brüstle A, Róka L, Bertschat F, Ibe K (1989) Enzyme catalytic concentrations in human plasma after a marathon. *Clin Biochem* 22:155–159. doi: 10.1016/S0009-9120(89)80015-3
- Song Y, Yang G, Dong Y (1996) [Immunohistochemical study of lactate dehydrogenase isoenzymes in gastric cancer: light and electron microscopic observations]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 18:266–269.

- Stokke O (1982) Clinical chemical changes in physical activity. *Scand J Soc Med Suppl* 29:93–101.
- Strømme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P (2004) Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37 degrees C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest* 64:371–384. doi: 10.1080/00365510410002742
- Suh K-I, Kim Y-K, Kho H-S (2009) Salivary levels of IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha in patients with burning mouth syndrome. *Arch Oral Biol* 54:797–802. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.05.007
- Szumilak D, Sułowicz W, Walatek B (1998) [Rhabdomyolysis: clinical features, causes, complications and treatment]. *Przegląd Lek* 55:274–279.
- Taichman NS, Cruchley AT, Fletcher LM, Hagi-Pavli EP, Paleolog EM, Abrams WR, Booth V, Edwards RM, Malamud D (1998) Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 78:869–875.
- Takagi Y, Yasuhara T, Gomi K (2001) [Creatine kinase and its isozymes]. *Rinsho Byori Suppl* 116:52–61.
- Taylor EC, Sethi B (2011) Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. *Br J Biomed Sci* 68:147–157.
- Teles RP, Likhari V, Socransky SS, Haffajee AD (2009) Salivary cytokine levels in subjects with chronic periodontitis and in periodontally healthy individuals: a cross-sectional study. *J Periodontal Res* 44:411–417. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01119.x
- Thomas MV, Branscum A, Miller CS, Ebersole J, Al-Sabbagh M, Schuster JL (2009) Within-subject variability in repeated measures of salivary analytes in healthy adults. *J Periodontol* 80:1146–1153. doi: 10.1902/jop.2009.080654
- Thorpe R, Sunderland C (2012) Muscle damage, endocrine, and immune marker response to a soccer match. *J Strength Cond Res Natl Strength Cond Assoc* 26:2783–2790. doi: 10.1519/JSC.0b013e318241e174
- Todorovic T, Dozic I, Vicente-Barrero M, Ljuskovic B, Pejovic J, Marjanovic M, Knezevic M (2006) Salivary enzymes and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11:E115-119.
- Toone RJ, Peacock OJ, Smith AA, Thompson D, Drawer S, Cook C, Stokes KA (2013) Measurement of steroid hormones in saliva: Effects of sample storage condition. *Scand J Clin Lab Invest* 1–7. doi: 10.3109/00365513.2013.835862

- Topal A, Gül N, İlçöl Y, Görgül OS (2003) Hepatic effects of halothane, isoflurane or sevoflurane anaesthesia in dogs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50:530–533.
- Topkas E, Keith P, Dimeski G, Cooper-White J, Punyadeera C (2012) Evaluation of saliva collection devices for the analysis of proteins. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 413:1066–1070. doi: 10.1016/j.cca.2012.02.020
- Totan A, Greabu M, Totan C, Spinu T (2006) Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? *Clin Chem Lab Med* 44:612–615. doi: 10.1515/CCLM.2006.096
- Touitou Y, Auzéby A, Camus F, Djeridane Y (2009) Daily profiles of salivary and urinary melatonin and steroids in healthy prepubertal boys. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* 22:1009–1015.
- Tsubakihara T, Umeda T, Takahashi I, Matsuzaka M, Iwane K, Tanaka M, Matsuda M, Oyamada K, Aruga R, Nakaji S (2013) Effects of soccer matches on neutrophil and lymphocyte functions in female university soccer players. *Lumin J Biol Chem Lumin* 28:129–135. doi: 10.1002/bio.2351
- Tvarijonaviciute A, Carrillo-Sanchez JD, García-Martinez JD, Tecles F, Martínez-Subiela S, German AJ, Ceron JJ (2014) Measurement of salivary adiponectin concentrations in dogs. *Vet Clin Pathol Am Soc Vet Clin Pathol* 43:416–421. doi: 10.1111/vcp.12169
- Upile T, Jerjes W, Kafas P, Harini S, Singh SU, Guyer M, Bentley M, Sudhoff H, Hopper C (2009) Salivary VEGF: a non-invasive angiogenic and lymphangiogenic proxy in head and neck cancer prognostication. *Int Arch Med* 2:12. doi: 10.1186/1755-7682-2-12
- Velayos JL (2012) *Anatomía de la Cabeza*. Ed. Médica Panamericana
- Wang Z, Li W, Hong X, Su J-Z, Hua H, Peng X, Lv L, Yu G-Y (2016) Minor salivary glands function is decreased in hyposalivation-related diseases. *Arch Oral Biol* 69:63–70. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.05.012
- Warrener L, Slibinskas R, Brown D, Sasnauskas K, Samuel D (2010) Development and evaluation of a rapid immunochromatographic test for mumps-specific IgM in oral fluid specimens and use as a matrix for preserving viral nucleic acid for RT-PCR. *J Med Virol* 82:485–493. doi: 10.1002/jmv.21693
- White DAE, Scribner AN, Huang JV (2009) A comparison of patient acceptance of fingerstick whole blood and oral fluid rapid HIV screening in an emergency department. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 52:75–78. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181afd33d

- Wolf PL (1985) Lactate dehydrogenase-6. A biochemical sign of serious hepatic circulatory disturbance. *Arch Intern Med* 145:1396–1397.
- Wolf PL, Lott JA, Nitti GJ, Bookstein R (1987) Changes in serum enzymes, lactate, and haptoglobin following acute physical stress in international-class athletes. *Clin Biochem* 20:73–77.
- Wroblewski F (1959) The clinical significance of transaminase activities of serum. *Am J Med* 27:911–923.
- Wróblewski F, LaDue JS (1956) Serum Glutamic Pyruvic Transaminase in Cardiac and Hepatic Disease. *Exp Biol Med* 91:569–571. doi: 10.3181/00379727-91-22330
- Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DTW (2013) Salivary Biomarkers: Toward Future Clinical and Diagnostic Utilities. *Clin Microbiol Rev* 26:781–791. doi: 10.1128/CMR.00021-13
- Yousef MA, Vaida S, Somri M, Mogilner J, Lanir A, Tamir A, Shaoul R (2006) Changes in creatine phosphokinase (CK) concentrations after minor and major surgeries in children. *Br J Anaesth* 96:786–789. doi: 10.1093/bja/ael077
- Yuan Z, Liu J, Liang X, Lin D (2012) Serum biochemical indicators of hepatobiliary function in dogs following prolonged anaesthesia with sevoflurane or isoflurane. *Vet Anaesth Analg* 39:296–300. doi: 10.1111/j.1467-2995.2011.00706.x
- Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Bortolini ER, Pavanello R de C, Peres CA (1991) Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 102:190–196.
- Zhang W (2005) Age-associated increase in creatine kinase-MB-specific activity in human serum confounds its use as an injury marker. *Heart Lung Circ* 14:104–106. doi: 10.1016/j.hlc.2005.01.006