

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Talmir Augusto Faria Brisola dos Santos**

**EFEITO DA LESÃO ELETROLÍTICA DO ÓRGÃO SUBFORNICIAL  
SOBRE OS PADRÕES CARDIOVASCULARES E SALIVATÓRIOS EM  
RATOS**

**Taubaté, SP**  
**2009**

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Talmir Augusto Faria Brisola dos Santos**

**EFEITO DA LESÃO ELETROLÍTICA DO ÓRGÃO SUBFORNICIAL  
SOBRE OS PADRÕES CARDIOVASCULARES E SALIVATÓRIOS EM  
RATOS**

Tese apresentada para obtenção do  
Título de Doutor pelo Programa de Pós-  
graduação em Odontologia do  
Departamento de Odontologia da  
Universidade de Taubaté.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Abrao Saad  
Co-orientador: Profa. Dra. Ana Christina  
Claro Neves

**Taubaté-SP**  
**2009**

**Ficha catalográfica elaborada pelo  
SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

S237e Santos, Talmir Augusto Faria Brisola dos  
Efeito da lesão eletrolítica do órgão subfornicial sobre os padrões  
cardiovasculares e salivatórios em ratos / Talmir Augusto Faria Brisola  
dos Santos. - 2009.  
65f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade de Taubaté, Programa de Pós-  
graduação em Odontologia, 2009.

Orientação: Prof. Dr. Wilson Abrao Saad, Departamento de  
Odontologia.

Co-orientação: Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves, Departamento  
de Odontologia.

1. Lesão OSF. 2. Pilocarpina. 3. Fluxo salivar. 4. Componentes de  
saliva. 5. Frequência cardíaca. 6. Pressão arterial. I. Título.

**TALMIR AUGUSTO FARIA BRISOLA DOS SANTOS**

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Universidade \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais por terem sido os meus primeiros mestres e modelos;*

*À minha esposa Rosângela , companheira paciente e amiga;*

*Aos meus filhos Thabata e João Vitor, presentes em todas as horas e  
que me ensinam a transcender as dificuldades desta vida*

*Aos meus irmãos Anamaria pelo apoio e Roberto Carlos pela ajuda  
incondicional .*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Wilson Abrão Saad, o qual tenho orgulho de ter como mentor e orientador.

Aos mestres que me instruíram ao longo de minha carreira, em especial a Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves minha co-orientadora, grande líder e empreendedora, que soube compreender quando precisei.

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Pró-reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UNITAU, pela amizade e, principalmente, por incentivar meu trabalho acadêmico.

Ao Prof. João Batista de Lima, pelo carinho e paciência constantemente renovados; pela troca de idéias e incentivo em todas as horas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação que me auxiliaram a finalizar estes créditos, em especial os Professores Doutores Leonorda Cunha, Marinella Houshausen e Gilson Franco, eternizados na memória.

À Universidade de Taubaté, que me formou, me especializou e me possibilitou prosseguir neste programa concedendo bolsa de estudo pela Pró-reitoria de Pesquisa e Pós graduação.

À equipe de apoio do Laboratório de Fisiologia, Farmacologia e Terapêutica da Universidade de Taubaté.

À equipe de apoio do Laboratório de Fisiologia, Farmacologia e Terapêutica da Universidade de Araraquara - Unesp.

A todos os colegas que direta ou indiretamente me ajudaram na elaboração deste trabalho.

Aos colegas de turma do Doutorado, Davi, Caio, Camila, Evânia, Fabiano, Marcelo e Nivaldo, pelos momentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Oscar César Pires e Profa. Dra. Naira Pelógia, colegas de trabalho e incentivadores constantes.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cotecchia Ribeiro pela atenção, apoio e sabedoria dedicado a minha pessoa quando eu precisei.

A dedicada Bibliotecária do Departamento de Informática, Regina Márcia Cuba, que com paciência me auxiliou em todas minhas dificuldades.

À Profa. Dra. Ana Júlia Urias dos Santos Araújo, diretora do Instituto Básico de Biociências - IBB UNITAU, pelo apoio incondicional ao longo desse Curso.

É com grande satisfação que concluo este trabalho, realizado com muito esforço e dedicação, pedindo a renovação das bênçãos de Deus, o GRANDE INCENTIVADOR.

SANTOS TAFB. Efeito da lesão eletrolítica do órgão subfornicial sobre os padrões cardiovasculares e salivatórios em ratos [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2009. 65p.

## RESUMO

**Hipótese do estudo:** O presente trabalho foi desenvolvido a partir da hipótese de que existe relação entre o órgão subfornicial de ratos (OSF) e o fluxo, conteúdo protéico e eletrolítico da saliva, pressão arterial e frequência cardíaca. **Proposição:** Objetivo deste estudo foi investigar a possível relação entre o órgão subfornicial (OSF) e o fluxo, conteúdo proteico e eletrolítico da saliva, pressão arterial e frequência cardíaca em ratos. **Metodologia:** Para o desenvolvimento do estudo, foram utilizados vinte ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus var. albinus*), pesando entre duzentos e cinquenta e trezentas gramas por meio de experimentação progressiva da fase 0 (F<sub>0</sub>) até a fase III (F<sub>III</sub>); Os vinte animais passaram pela estimulação salivar (F<sub>0</sub> e F<sub>I</sub>), depois pela canulação do OSF- “ lesão fictícia” (F<sub>II</sub>) e posteriormente pela lesão eletrolítica (F<sub>III</sub>), Com a lesão no OSF, permitiu averiguar a participação dos corpos celulares e fibras de passagem presentes na região reguladora da secreção salivar, fluxo salivar, conteúdo proteico e eletrolítico da saliva e as alterações nos padrões cardiovasculares. Para efetivação da lesão no OSF,(F<sub>III</sub>) um eletrodo de aço inoxidável com 0.5mm de diâmetro de ponta, sem isolamento, foi introduzido na área do OSF pela cânula previamente posicionada na (F<sub>II</sub>). No quinto dia do período pós-operatório, o fluxo salivar foi estimulado com uso da pilocarpina injetada intraperitonealmente (IP) em todas as fases e os animais da (F<sub>I</sub>) usados como referência em relação aos lesionados fictícios e eletrolíticos considerados Fase III. Em todas as fases do experimento, determinou-se o conteúdo protéico e eletrolítico da saliva, e os padrões cardiovasculares e pressóricos. **Resultados:** Os resultados foram apresentados como média e erro padrão médio. Para avaliação da interação entre fatores (lesão/droga/efeito) foi utilizada o teste de Newman post-hoc (p<0,05). Foi evidenciada relação da lesão do OSF (F<sub>III</sub>) com os padrões cardiovasculares, demonstrando efeito hipertensor da pilocarpina (F<sub>II</sub>) (32±6mmHg) em relação à (F<sub>III</sub>) (9±4mmHg), aumento da Frequência Cardíaca (F<sub>0</sub> e F<sub>II</sub>) (310±18bpm) e redução significativa da FC em (F<sub>III</sub>) (233±23bpm) (p<0,05) Com relação ao Fluxo salivar houve redução em (F<sub>III</sub>) em relação à (F<sub>I</sub> e F<sub>II</sub>) (177± 17mg/7min), (501±24mg/7min) respectivamente. **Conclusões:** O OSF está intimamente relacionado com as alterações do fluxo salivar, secreção, conteúdo protéico e eletrolítico da saliva e alterações cardiovasculares em ratos.

**Palavras-chave:** Lesão OSF; Pilocarpina; Fluxo salivar; Componentes da saliva; Frequência cardíaca; Pressão arterial.



SANTOS TAFB. Effect of the electrolyte injury of the subforaminal agency on the Cardiovascular and Salivary Standards in Rats [Tese de doutorado]. Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2009. 65p.

## ABSTRACT

**Hypothesis of the study:** Hypothesis of the study: The present work was developed from the hypothesis that exists a relation enters the subforaminal agency of rats (OSF) and the flow, protein and electrolyte content of the saliva, blood pressure and heart rate. **Proposition:** Objective of this study was to investigate the possible relation between the subforaminal agency (OSF) and the flow, content protein and electrolyte of the saliva, blood pressure and heart rate in rats. **Methodology:** For the development of the study, (20) twenty adult male rats of the race Wistar (*Rattus norvegicus var. albinus*), weighing between two hundred and fifty and three hundred grams by means of gradual experimentation of phase 0 (F0) until the III phase (FIII); The twenty animals had passed for the salivary stimulation (F0 and FI), later for the cannulation of the OSF- "fictitious injury" (FII) and later for the electrolyte injury (FIII), With the injury in the OSF, allowed to inquire the participation of the cellular bodies and staple fibres present in the regulatory region of the salivary secretion, salivary flow, protein and electrolyte content of the saliva and the changes in the cardiovascular standards. For efficacy of the injury in the OSF, (FIII) a stainless steel electrode with 0.5mm of tip diameter, without isolation, was introduced in the area of the OSF for the cannula previously located in (FII). In the fifth day of the postoperative period, the salivary flow was stimulated with use of the pilocarpine injected intraperitoneally (IP) in all the phases and the animals of (FI) used ones as reference in relation to the fictitious and electrolyte injured ones considered Phase III. At all stages of the experiment, we determined the protein and electrolyte content of saliva, and blood pressure patterns and cardiovascular. **Results:** The results had been presented as average and error average standard. For evaluation of the interaction between factors (injury/drug/effect) the test of Newman was used post-hoc ( $p < 0,05$ ). Was evidenced relation of injury of OSF (FIII) with cardiovascular standards, demonstrating effect hypertensive of pilocarpine (FII) (32 (6mmHg) in relation to (FIII) (9 (4mmHg), increase of Heart Rate(F0 and FII) (310 (18bpm) and significant reduction of the FC in (FIII) (233 (23bpm) ( $p < 0,05$ ) With regard to the salivary flow had reduction in (FIII) in relation to (FI and FII) (177 (17mg/7min), (501 (24mg/7min) respectively. **Conclusions:** The OSF is closely related to changes in salivary flow, secretion, protein and electrolyte content of saliva and cardiovascular changes in rats.

**keywords:** Lesion OSF; Pilocarpine; Salivary flow; Saliva components; Heart rate; Blood pressure.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	13
2.1 IMPORTÂNCIA DA SALIVA	13
2.2 XEROSTOMIA	14
2.3 SECREÇÃO E FLUXO SALIVAR	16
2.4 SALIVAÇÃO INDUZIDA PELA PILOCARPINA	18
2.5 REGIÕES ENCEFÁLICA RELACIONADAS À SECREÇÃO SALIVAR	20
2.6. ESTRUTURA DO ÓRGÃO SUBFORNICIAL (OSF) E SUA RELAÇÃO COM PADRÕES SALIVARES E CARDIOVASCULARES	21
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	27
<b>4 METODOLOGIA</b>	28
4.1 ANIMAIS	28
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	28
4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA CANULAÇÃO	31
4.4 LESÃO ELETROLÍTICA	32
4.5 FLUXO SALIVAR	33
4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA	34
4.7 REGISTROS DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	35
4.8 HISTOLOGIA	36
<b>5 RESULTADOS</b>	38
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA	38
5.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (1, 2, 4, 8, 16MG.KG.ML <sup>-1</sup> ) NO FLUXO SALIVAR DE RATOS CONTROLE (F <sub>I</sub> ) E COM “LESÃO FICTÍCIA” DO OSF (F <sub>II</sub> )	39
5.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (1, 2, 4, 8, 16MG.KG.ML <sup>-1</sup> ) NO FLUXO SALIVAR DE RATOS COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF (F <sub>III</sub> ) COMPARADO AOS RATOS (F <sub>I</sub> ) E (F <sub>II</sub> )	40
5.4 FLUXO SALIVAR DE RATOS CONTROLE (F <sub>0</sub> ), COM “LESÃO FICTICIA” DO OSF (F <sub>II</sub> ) E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF (F <sub>III</sub> ) APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML <sup>-1</sup> )	41
5.5 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML <sup>-1</sup> ) NO FLUXO SALIVAR E	

NOS COMPONENTES PROTEICOS E ELETROLÍTICOS DA SALIVA DOS ANIMAIS (F <sub>0</sub> ) E COM “LESÃO FICTÍCIA” DO OSF (F <sub>II</sub> )	41
<b>5.5.1 Fluxo salivar</b>	42
<b>5.5.2 Proteína total</b>	42
<b>5.5.3 Amilase salivar</b>	42
<b>5.5.4 Cálcio</b>	42
<b>5.5.5 Sódio e potásio</b>	43
5.6 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML <sup>-1</sup> ) NO FLUXO SALIVAR E NOS COMPONENTES PROTEICOS E ELETROLÍTICOS DA SALIVA DOS ANIMAIS (F <sub>0</sub> e F <sub>I</sub> ) E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF (F <sub>III</sub> )	44
<b>5.6.1 Fluxo salivar</b>	44
<b>5.6.2 Proteína total</b>	44
<b>5.6.3 Amilase salivar</b>	44
<b>5.6.4 Cálcio</b>	45
<b>5.6.5 Sódio e potásio</b>	45
5.7 EFEITO DO ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML <sup>-1</sup> ) NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) DE RATOS CONTROLE (F <sub>0</sub> ), COM “LESÃO FICTÍCIA” DO OSF (F <sub>II</sub> ), E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF (F <sub>III</sub> )	46
5.8 EFEITO DO ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML <sup>-1</sup> ) NA FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE RATOS CONTROLE (F <sub>0</sub> ), COM “LESÃO FICTÍCIA” DO OSF (F <sub>II</sub> ), E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF (F <sub>III</sub> )	47
<b>6 DISCUSSÃO</b>	49
6.1 FLUXO SALIVAR	49
6.2 CONTEÚDO PROTÉICO E ELETROLÍTICO DA SALIVA	51
6.3 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	53
<b>7 CONCLUSÕES</b>	56
<b>REFERÊNCIAS</b>	57
<b>ANEXOS</b>	64

## 1 INTRODUÇÃO

A saliva é um fluido aquoso e transparente, secretado pelas glândulas salivares diretamente na cavidade oral e de fundamental importância no desempenho de diversas atividades funcionais como digestão, deglutição, mastigação e fala. Adicionalmente, tem ação na remineralização dos dentes, tamponamento do pH e higiene bucal. Ainda, sua atuação na termorregulação e a ingestão de sódio como atividades comportamentais, foi relatada por Flynn et al.(1981), Matsuo & Yamamoto (1989), Jensen et al.(1991), Ferguson (1993) e Freitas et al. (1994).

Dentre os constituintes da saliva, a fluidez é produzida por estimulação parassimpática e o componente proteico liberado em resposta à estimulação simpática. A secreção salivar é estimulada principalmente pelo sistema nervoso autônomo e seu fluxo pode sofrer alterações como consequência do uso de drogas diversas, principalmente antidepressivos, antipsicóticos, atropinas, bloqueadores dos canais de cálcio e anti-histamínicos (Scully, 2003; Kopittke et al., 2005).

A redução do fluxo salivar, provoca sensação de desconforto, com frequente sensação de sede e dificuldade na mastigação, deglutição e fala. Como a saliva exerce papel na proteção das estruturas dentais, promovendo a limpeza e mantendo a capacidade de solução tampão, o tecido dental fica menos susceptível à cárie (Puy, 2006). A inexistência da película salivar entre a túnica mucosa e a base das próteses total e removível, dificulta o uso das mesmas e favorece o aparecimento de infecções e lesões nas túnicas mucosas, fissura e atrofia das papilas filiformes no dorso da língua (Neville & Dam, 2004).

A xerostomia ou secura da boca é um problema clínico sério e que atinge milhões de pessoas (Fox et al., 1985). Pode estar associada com o tratamento radioterápico na região da cabeça e pescoço, com o uso de uma variedade de medicamentos e constitui a manifestação importante da síndrome de Sjögren. Assim pacientes com xerostomia total ou parcial exibem sinais e sintomas que incluem boca seca, ardência da mucosa bucal, dificuldade de deglutição, redução da precisão gustativa, dificuldade de articular as palavras, infecções da mucosa oral, maior incidência de cárie dental, periodontopatias, dificuldade de uso de prótese total e sialodinite bacteriana (Ferguson, 1993; Wiseman & Faulds, 1995).

A pilocarpina, uma droga que induz a produção de saliva, é uma substância colinérgica agonista, extraída de uma planta popularmente conhecida como jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*). Age principalmente em receptores muscarínicos e apresenta efeito estimulatório nos receptores M1 dos gânglios autônomos. A ativação dos receptores colinérgicos M1 das glândulas salivares é responsável pela grande secreção de saliva enquanto a estimulação do gânglio cervical simpático superior resulta em ativação dos receptores glandulares adrenérgicos beta e da secreção proteica (Takakura et al., 2003; Gotrick et al., 2004; Sato et al., 2006).

O órgão subfornicial (OSF) é um órgão localizado no diencéfalo, sendo um dos órgãos dos núcleos septais e estruturas pertinentes, emitindo axônios para diversos núcleos hipotalâmicos, situado logo abaixo do fórnice. Os seus neurônios possuem receptores para a angiotensina II, produto final de uma cadeia de hormônios de origem renal que dentre várias ações causa sede e sinaliza a necessidade de ingestão e retenção de água; os axônios do OSF terminam em núcleos hipotalâmicos reguladores da homeostasia hídrica do organismo.

O OSF é importante por se tratar de uma área que atua no controle da osmolaridade e da secreção de ADH, localizada ao longo da região ântero-ventral do terceiro ventrículo, chamado de região AV3V. O OSF localiza-se na parte superior desta região, enquanto que, na parte inferior, há uma outra estrutura, chamada de órgão vascular da lâmina terminal. Tanto o OSF quanto o órgão vascular da lâmina terminal têm suprimentos vasculares que não apresentam a típica barreira hematoencefálica presente em outras regiões do cérebro, que impede a difusão da maioria dos íons do sangue para dentro do tecido cerebral. Isto torna possível que os íons e outros solutos atravessem do sangue para o líquido intersticial nesta região. Desta forma, os osmoceptores respondem rapidamente a alterações da osmolaridade do líquido extracelular, exercendo um controle poderoso sobre a secreção de ADH e a sede (Guyton & Hall, 1996).

Partindo do conhecimento de que o OSF participa da homeostase dos fluidos corporais (Mangiapane & Simpson, 1980; Lind & Johnson, 1982; Thunhorst et al., 1990; Yang et al., 1996). Este trabalho teve como objetivo investigar a possível relação entre a lesão eletrolítica do OSF de ratos, produzida logo abaixo do corpo caloso, o fluxo salivar, conteúdo proteico e eletrolítico da saliva, pressão arterial e frequência cardíaca.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 IMPORTÂNCIA DA SALIVA

A saliva está relacionada com diversas atividades funcionais como digestão, deglutição, mastigação e fala e desempenha papel fundamental na remineralização dos dentes, tamponamento do pH e higiene bucal, além de atuar na termorregulação e em atividades comportamentais como a ingestão de sódio (Flynn et al., 1981; Matsuo & Yamamoto, 1989; Jensen et al., 1991; Ferguson, 1993; Freitas et al., 1994).

A saliva é composta por 99% de água e 1% de componentes orgânicos e inorgânicos. Os principais componentes inorgânicos são: sódio, potássio, cloreto de cálcio, fosfato e bicarbonato. Todos eles contribuem para a plena capacidade funcional da saliva. O cálcio e o potássio são de grande importância para a remineralização da superfície dos dentes após a ação do ácido. O bicarbonato e os componentes orgânicos contribuem para a capacidade tampão da saliva (Guyton & Hall, 1996). Chezzi et al. (2000), demonstraram que 45% de variação na taxa de fluxo salivar é considerada normal enquanto que valores abaixo de 45% podem ser definidos como hipofunção salivar.

Outra importante função da saliva é a redução da atividade redox (forma combinada indicando um sistema ou reação de oxidação-redução) causada pela transição dos íons metálicos, fator correlacionado ao seu conteúdo protéico (Nagler et al., 1997).

## 2.2 XEROSTOMIA

Neville & Dam (2004) descreveram a xerostomia como uma sensação de secura na boca e a definiram como consequência de patologias como aplasia glandular, perda de água e metabólitos — hemorragia, vômito e diarreia, doenças e condições sistêmicas como a síndrome de Sjögren, diabetes melito, diabetes insípido, sarcoidose, infecção por HIV e doenças psicogênicas. Também pode ocorrer como efeito colateral do uso de medicamentos anti-histamínicos, descongestionantes nasais, antidepressivos, antipsicóticos, anti-hipertensivos e anticolinérgicos. Pode ser um efeito colateral do tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço ou decorrente de fatores locais como dificuldade na deglutição, tabagismo e ou respiração bucal. A xerostomia dificulta a mastigação, a deglutição, causa sensação de ardência na túnica mucosa oral e favorece o desenvolvimento da candidose devido à redução da limpeza e da atividade antimicrobiana. Além disso, seus portadores têm maior propensão à cárie dental, especialmente as cervicais e radiculares.

A mais severa forma de disfunção salivar resulta da lesão e da perda das células acinares salivares que ocorre, quase sempre, em consequência do tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço. Os efeitos da xerostomia incluem atonia física geral e, devido à dificuldade de articulação das palavras, o afastamento social do paciente, provocando severos distúrbios psicológicos.

Desta forma a xerostomia total ou parcial leva o paciente a um quadro de repetidas infecções na cavidade oral, dificuldade na fala, maior propensão às cáries dentais, faringite, laringite, rinite seca e traqueobronquites, voz bitonal, tosse seca,



dificuldade de deglutição, perda de apetite, aquilia (ausência de pepsina e de ácido clorídrico no suco gástrico), dificuldade no uso de próteses totais ou parciais removíveis, piorando a síndrome de Sjögren.

A percepção e o diagnóstico da disfunção das glândulas salivares é clinicamente relevante considerando a importância das mesmas para as atividades fisiológicas da cavidade oral, faringe e a parte superior do trato gastrintestinal. Os sintomas da xerostomia como alteração do paladar, dificuldade de mastigação e deglutição, frequentemente fazem com que seus portadores restrinjam à ingestão de alimentos (Hughes et al., 1987). A significativa consequência da disfunção salivar na cavidade oral é a grande incidência de cáries, requerendo extenso tratamento restaurador ou ainda provocando a perda dos elementos dentais. Desta forma, a qualidade de vida é afetada pelos sintomas da seca da boca, seja devido a dificuldade de degustar os alimentos ou ao desconforto com os frequentes tratamentos dentários.

Puy (2006) relatou as funções da saliva na manutenção da saúde oral e no diagnóstico de certas patologias, e as principais causas da redução da secreção salivar. Segundo o autor, estudos relataram que a hipossalivação provoca sensação de boca seca, dificuldade de deglutição e fala, sensação de sede frequente com consequente necessidade de ingestão de água, dificuldade na mastigação de alimentos secos e no uso de próteses totais ou parciais removíveis, dor e irritação da túnica mucosa oral, propensão à infecção por *Candida*, fissuras no dorso da língua e quelite angular. O autor relatou também que diminuição do fluxo salivar pode ser fisiológica e variável de acordo com a idade, quantidade de dentes na boca e período do dia, ou patológica e, neste caso, como consequência do uso de

medicamentos, principalmente os antidepressivos, antipsicóticos e anti-hipertensivos ou do tratamento radioterápico na região de cabeça e do pescoço.

Abollahi & Radfar (2008) afirmaram que vários medicamentos podem causar xerostomia, principalmente aqueles com ação anticolinérgica, simpatomimética ou diurética. Segundo os autores, a saliva exerce importante função na mastigação, no início da digestão e na lubrificação do bolo alimentar, além de proteger a túnica mucosa oral e as superfícies dentais devido a capacidade antimicrobiana consequente da sua composição química que inclui mucinas, histatinas, lisoenzimas, lactoferrina e anticorpo IgAs. Os autores abordaram as consequências da redução salivar e verificaram que as mais comuns são a maior propensão ao desenvolvimento de cáries e as infecções fúngicas. Como tratamento da xerostomia, sugeriram a administração de pilocarpina.

Uma das formas de amenizar o desconforto provocado pela redução da secreção salivar é com o uso de drogas sialogogas. A pilocarpina tem sido usada durante o último século como o melhor agente sialogogo entre todos os outros agentes colinérgicos (Ferguson, 1993).

## 2.3 SECREÇÃO E FLUXO SALIVAR

Myoshi (2008), em estudo sobre a semiologia das glândulas salivares, apresentou uma técnica de estimulação mastigatória para avaliação do fluxo salivar. A referida técnica consistia na mastigação de um pedaço de parafina ou de borracha por 11 minutos. No primeiro minuto a saliva produzida era desprezada, coletada nos dez minutos restantes e então, quantificada. Segundo o autor, a análise do material

coletado permitia verificar se o fluxo salivar era normal, baixo ou muito baixo, de acordo com os seguintes fatores: velocidade (medida em minutos) e quantidade (medida em mL). Os dados obtidos eram classificados em: fluxo normal (1 – 3mL/min), fluxo baixo (0,7 – 0,9mL/min) e fluxo muito baixo (menos de 0,7mL/min). O autor afirmou que a redução do fluxo salivar pode ser decorrente de fatores diretamente relacionados com o sistema nervoso simpático, como o processo fisiológico de envelhecimento, doenças sistêmicas e uso crônico e prolongado de fármacos anti-hipertensivos e diuréticos, ou ainda do uso de drogas com ação específica sobre o sistema nervoso central, como os benzodiazepínicos e antidepressivos, que promovem a liberação de neurotransmissores, gerando efeito anticolinérgico e reduzindo o estímulo parassimpático sobre as glândulas salivares.

Sabe-se que a secreção de saliva pode ser espontânea ou estimulada pela ativação de receptores autônomos glandulares (Ohlin & Pereg, 1965; Templeton & Thulin, 1978; Garrett & Anderson, 1991). Quando receptores adrenérgicos das glândulas salivares, (Norberg & Olson, 1965; Martinez & Cassity, 1983; Elverdin et al., 1984; Baum, 1987; Jensen et al., 1991; Izumi & Karita, 1995) e receptores colinérgicos muscarínicos M1 glandulares (Emmelin, 1987; Garrett, 1987; Parkinson, 1990; Izumi & Karita, 1994; Hiramatsu et al., 1995) são ativados, ocorre aumento da secreção salivar basal. Os dois principais mecanismos de sinal de transdução resultam na secreção de saliva pelas células acinares da glândula parótida. No primeiro tipo de mecanismo os receptores beta-adrenérgico ativam a adenilciclase e levam à formação do AMPc através do ATP e no segundo, os receptores muscarínico-colinérgicos ativam a fosfolipase C, levando à hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, o que resulta na formação do diacilglicerol e inositol trifosfato. Desta forma, a secreção fisiológica da saliva depende tanto de receptores

adrenérgicos como colinérgicos (Norberg & Olson, 1965; Baum, 1987; Garrett, 1987). Os receptores alfa-1 parecem ser os principais mediadores da secreção de proteína nos ductos salivares (Garrett & Anderson, 1991) e têm efeito sialogogo considerável (Elverdin et al., 1984). Já os beta receptores, são os principais mediadores da secreção de proteínas nos ácinos (Garrett & Anderson, 1991). Os receptores muscarínicos M1 têm papel importante na secreção de líquido, resultando em grande volume de saliva secretada, porém com baixa concentração de proteína (Garrett, 1987). As glândulas submandibulares e sublinguais de ratos possuem alta densidade de receptores muscarínicos e pequena de alfa-1 e beta, sugerindo que elas sejam mais importantes para a secreção de líquidos do que as glândulas parótidas (Martinez & Cassity, 1983; Garrett & Anderson, 1991).

## 2.4 SALIVAÇÃO INDUZIDA PELA PILOCARPINA

A *Pilocarpus jaborandi*, popularmente chamada jaborandi, é uma planta descoberta pelos índios da América do Sul e cuja mastigação causa salivação e sudorese. Foi estudada pela primeira vez por Symphoronio Coutinho, médico baiano que em 1873 levou amostras das folhas para Paris. Na Europa, o suor e salivação provocados pelas folhas chamaram a atenção dos médicos que realizaram pesquisas com o objetivo de conhecer seus efeitos terapêuticos e encontrar a explicação para sua ação nas glândulas salivares e sudoríferas. Após um ano de pesquisas, foi publicado o primeiro estudo que relatava que "o jaborandi aumenta enormemente a transpiração e a salivação, a secreção das membranas mucosas do nariz, dos tubos bronquiais, do estômago e intestinos". Nesta época, folhas de

jaborandi estavam sendo empregadas no tratamento de doenças como estomatite, laringite, bronquite, gripe, pneumonia, intoxicações, neurose e doença renal (Budavari, 1989).

Da *Pilocarpus jaborandi* foi isolado um alcalóide denominado pilocarpina Gerrard (1875) apud Ferguson (1993) estudou e demonstrou que a pilocarpina tinha um agonismo colinérgico predominante em receptores muscarínicos, com efeito estimulatório nos receptores M1 dos gânglios autônomos. A ativação de receptores colinérgicos M1 das glândulas salivares é responsável pela grande secreção de saliva (Wiseman & Faulds, 1995), enquanto que a estimulação do gânglio cervical simpático superior resulta na ativação de receptores glandulares adrenérgicos beta e secreção proteica (Zelles et al., 1990; Garrett & Anderson, 1991; Ferguson, 1993).

Renzi (1994) investigou os efeitos da injeção de pilocarpina no sistema nervoso central (SNC) sobre a salivação e verificou que a injeção do alcalóide no ventrículo lateral do cérebro de rato causa hipersecreção salivar dependente principalmente de receptores do tipo M1 centrais, embora pareça que a pilocarpina ative com pouca seletividade todos os receptores M centrais (Hoss et al., 1990). A salivação induzida pela injeção de pilocarpina intracerebroventricular, bem como sistêmica, é inibida pela lesão de estruturas cerebrais pré-óptico paraventricular (Renzi et al., 1993; Saad et al., 1999), sugerindo a participação de estruturas centrais na salivação induzida pela estimulação colinérgica central e periférica.

O hidrocloreto de pilocarpina, estimula o fluxo salivar das glândulas salivares menores em pacientes com síndrome de Sjögren (Rhodus, 1997). O modo como a irradiação induz à hipofunção das glândulas salivares permanece um processo parcialmente desconhecido. Em contraste, a estimulação com pilocarpina,

prévia à irradiação, leva a uma degranulação marginal da glândula parótida e oferece proteção próximo dos 13% (Nagler et al., 1997).

Kuijper & Kramer (1975) observaram que a pilocarpina induzia maior secreção de proteína pelas células acinares que pelas células do ducto glandular, corrigindo anormalidades das glândulas salivares, regulando o fluxo da saliva, bem como sua composição eletrolítica. Estes achados são corroborados por Nagler & Nagler (2001)

## 2.5 REGIÕES ENCEFÁLICAS RELACIONADAS À SECREÇÃO SALIVAR

Estudos foram realizados para verificar a participação de áreas do sistema nervoso central em muitos parâmetros fisiológicos. Uma das técnicas utilizadas é a de lesão eletrolítica (Saad et al., 1981). Esta lesão destrói tanto fibras de associação como os corpos celulares. A lesão citotóxica pela utilização do ácido ibotênico destrói somente os corpos celulares (Vale et al., 1997). Mais recentemente foi demonstrada a influência de lesões eletrolítica e química pelo ácido ibotênico da área septal sobre a ingestão de água e cloreto de sódio (Saad et al., 1998). Trabalhos recentes realizados no laboratório da Unesp em Araraquara, Departamento de Fisiologia utilizando a secção do nervo corda do tímpano e a ganglionectomia, demonstraram que existe uma contribuição do sistema simpático na secreção salivar induzida pela ativação central colinérgica (Cecanho et al., 1999). Ficou demonstrado que a área pré-óptica medial (MnPO) interfere na ação periférica de indução da salivação realizada pela pilocarpina. Estudo envolvendo o OSF e a influência do óxido nítrico (ON) nos efeitos da pilocarpina sobre os padrões salivares e cardiovasculares quando injetada no OSF, foi realizado por Saad et al. (2007).

Lesão química da região AV3V altera o fluxo salivar induzido pela pilocarpina injetada no 3<sup>o</sup>V de ratos com influência sobre os parâmetros cardiovasculares. Estes resultados demonstraram que os corpos celulares desta região influenciam o fluxo salivar (Mckinley, 1992; Saad et al., 2007).

A figura 1 abaixo mostra as inter-relações entre o OSF e outras estruturas circumventriculares implicadas na regulação hidroeletrólítica e cardiovascular do organismo.

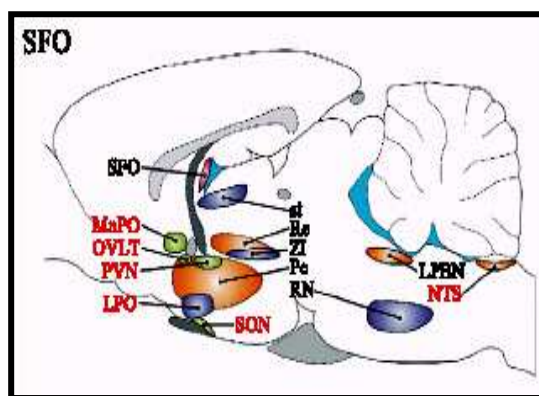


Figura 1 - Neurônios eferentes do OSF para outros sítios centrais. Núcleo paraventricular (PVN); Hipotálamo anterior; Núcleo preóptico medial (MNPO); Núcleo supraóptico (SON); Órgão vasculoso da lâmina terminal (OVL); Área septal medial (Saad et al., 2007)

## 2.6 ESTRUTURA DO ÓRGÃO SUBFORNICIAL (OSF) E SUA RELAÇÃO COM PADRÕES SALIVARES E CARDIOVASCULARES

O OSF é uma estrutura circumventricular; é um órgão localizado no diencéfalo, sendo um dos órgãos dos núcleos septais e estruturas pertinentes, emitindo axônios para diversos núcleos hipotalâmicos, situado logo abaixo do corpo caloso ( fibras de associação inter-hemisféricas) O OSF participa da regulação da homeostase dos

fluidos corporais (Mangiapane & Simpson, 1980; Thunhorst et al., 1990; Yang et al., 1996). Esses neurônios estão eferentemente conectados a uma cadeia de neurônios centrais e aos tecidos vasculares e secretores das glândulas submandibulares e sublinguais (Hubschle et al., 1998; Saad et al., 2003).

Sabe-se que regularizar a ingestão de água é fator de grande importância para a manutenção do fluxo salivar e tanto o óxido nítrico como a ANGI (angiotensina II) têm importância nesta regulação. A função do OSF na regulação da ingestão de água e sódio induzida pela estimulação adrenérgica do hipotálamo lateral foi demonstrada (Almeida et al., 1999), mas a participação do OSF na regulação das funções das glândulas salivares ainda não foi estudada quando da estimulação colinérgica pela pilocarpina.

Estudos experimentais demonstraram que a pilocarpina altera a concentração salivar de proteína total, amilase, sódio e potássio, mas não do cálcio. Além da angiotensina e aldosterona influenciarem o nível do cálcio orgânico, outros mecanismos, ainda não bem definidos, como a pilocarpina, também parecem ter alguma atuação (MacDougall et al., 1984).

Thunhorst et al. (1990) examinaram os efeitos da lesão do OSF em ratos machos da raça Sprague Dawley (325-350g). Os resultados mostraram que a administração de vasodilatador em ratos hipovolêmicos aumentava a ingestão de água e sódio, porém essa ação era inibida pela administração de um antagonista do sistema renina-angiotensina. Também foi observado que a lesão do OSF reduzia significativamente a ingestão de água e sódio decorrente do tratamento dos ratos hipovolêmicos tratados com vasodilatador ou inibidor do sistema renina-angiotensina. Os autores sugeriram que a lesão do OSF provoca maior efeito sobre a indução da ingestão de sódio do que o apetite crônico ou mais lento para sódio.



Simon (2000) descreveu o órgão circumventricular como alvo dos mensageiros da circulação, modulando o controle central de sódio e o balanço dos fluidos corporais. De acordo com o autor, o OSF estimula a sede por meio de altos níveis de angiotensina II circulante e a deficiência de sódio na composição salivar, em ovelhas, fez com que angiotensina II fosse elevada, induzindo à ingestão de solução de bicarbonato de sódio ao invés de água. O aumento plasmático de angiotensina II em aves teve ação central como inibidor da secreção de sódio na saliva. O autor relatou ter encontrado em estudo anterior (Matsumura & Simon, 1990), um aumento na sensibilidade neuronal à angiotensina II como evidência para o alvo da ação dos neurônios do OSF. O autor concluiu que os órgãos circumventriculares têm importante papel no controle de sódio e fluidos corporais.

Pastuskovas et al. (2003) examinaram a atividade nos componentes centrais da cadeia neural, como estruturas do órgão vascular da lâmina terminal, OSF, núcleo pré-óptico mediano, hipotálamo, núcleo supra-óptico, núcleo paraventricular, que, subservindo sódio, haviam sofrido depressão de fluido corporal quando diminuída a ingestão de sódio. Foi observado que os animais que não haviam sofrido depressão de fluido corporal não ingeriram água ou concentração salina nas duas horas em que tiveram acesso a ela. Entretanto, os animais com depressão de fluido corporal ingeriram grande quantidade de água e solução salina. Pelos resultados obtidos, os autores concluíram que a região do hipotálamo é responsável pelo controle homeostático dos fluidos corporais.

Cottrell & Ferguson (2003) revisaram os estudos, focando a ação dos órgãos circumventriculares sobre as funções cardiovasculares, os fluidos corporais e o apetite. Os autores relataram que a lesão do OSF previne o efeito hipotensivo dos bloqueadores de receptores de angiotensina e inibe a ingestão de água e salina em

animais com depressão de sódio. Sugeriram que o OSF é um centro crítico de associação através do qual o sistema nervoso central é capaz de monitorar a angiotensina circulante e sua influência na função cardiovascular. Estimulação química ou elétrica do OSF resulta na ativação da secreção de fluidos expelidos por ação simpática. A destruição completa do órgão vascular da lâmina terminal foi relatada como inibidor da sede em animais desidratados ou que receberam infusão salina hipertônica, sugerindo que a pressão osmótica ou mudança de volume dos fluidos é detectada pelo órgão vascular da lâmina terminal e pelo OSF. Os autores concluíram que é importante o estudo isolado de cada órgão circunventricular devido as suas complexas funções.

Collister & Hendel (2003) investigaram a influência do OSF no efeito hipotensivo crônico do losartan em ratos saudáveis. Depois de uma semana após a cirurgia, foi realizada infusão de angiotensina II para verificar se os animais que haviam sofrido lesão do OSF respondiam a este procedimento ingerindo água, já que a lesão do OSF provoca a demora e a menor ingestão de água. Os autores observaram que a lesão do OSF não alterava a pressão sanguínea, produzia menor resposta ao uso crônico do losartan e reduzia a retenção crônica de sódio nos ratos tratados com losartan, concluindo que o OSF influencia na diminuição da pressão sanguínea resultante do uso do losartan.

Esses autores também investigaram a hipótese do OSF ser uma região central da ação de angiotensina II endógena nos receptores de angiotensina I. Observaram ainda que a ingestão de água nos ratos com lesão do OSF foi significativamente menor do que nos ratos com “lesão fictícia”, e que a lesão do órgão não alterou a pressão arterial, além de reduzir a resposta hipotensiva do losartan, sugerindo este órgão circunventricular como área de mediação aos efeitos

da angiotensina II endógena. Com esses resultados os autores concluíram que o OSF tem ação na regulação da pressão sanguínea por ação da angiotensina II endógena.

Starbuck & Fitts (2003) examinaram a importância do OSF na inibição da ingestão de alimentos durante a elevação da pressão osmótica decorrente da perda de água. Os animais que tiveram o OSF lesado demoravam para ingerir água após se alimentarem, em comparação com os animais que não tinham lesão, adicionalmente, ingeriam menor quantidade de água. Desta forma, os autores relataram que o OSF tem papel importante para iniciação da ingestão de água associada à refeição.

Fitts et al. (2004) compararam os efeitos entre ratos com lesões do OSF e do órgão vascular da lâmina terminal com ratos com lesão apenas do OSF ou do órgão vascular da lâmina terminal. Os autores observaram que houve maior diminuição na ingestão de água e salina nos ratos com as duas lesões. Sendo assim, concluíram que a lesão do OSF, quando associada à lesão do órgão vascular da lâmina terminal, é mais eficiente do que uma única lesão para testes de diminuição de sódio.

Mckinley & Johnson (2004) estudaram a regulação fisiológica da sede e da ingestão de fluidos. Os autores relataram que o órgão vascular da lâmina terminal e o OSF são os mais prováveis centros de osmorreceptores e que para a angiotensina II induzir a sede é necessário o envolvimento do OSF. Os autores também citaram que o OSF tem receptores para relaxin o qual influencia na homeostase dos fluidos corporais estimulando a secreção de vasopressina e a ingestão de água. Os autores concluíram que a regulação osmótica da ingestão de fluidos é multifatorial, ou seja, depende de fatores osmóticos, hormonais, iônicos e de sinais nervosos.

A ativação de receptores muscarínicos localizados no sistema cardiovascular produz vasodilatação e hipotensão, enquanto a ativação de receptores muscarínicos centrais induz à vasoconstrição e à resposta pressora, possivelmente por ativação simpática e liberação de vasopressina (Takakura et al., 2005).

Noda & Hiyama (2005) estudaram a importância do OSF e do órgão vascular da lâmina terminal no controle da presença de sódio e do consumo de sal. Os autores observaram que os animais com deficiência dos canais de sódio apresentavam hiperatividade neuronal do OSF e do órgão vascular da lâmina terminal e ingeriam quantidade excessiva de sal. Além disso, a injeção de solução hipertônica de sódio no 3º V induzia à ingestão de água e provocava aversão por solução salina em ratos normais. Em animais com deficiência dos canais de sódio, não havia aversão à solução salina. Os autores indicaram que os canais de sódio no OSF são essenciais e suficientes para o controle da ingestão de sal. Sendo assim, concluíram que este órgão constitui a principal região de controle para o comportamento de ingestão de sal, sendo, pois, os canais de sódio, sensores para o nível de sódio.

nervoso

Inenaga et al. (2008) sugeriram que, a secreção salivar ativada pela pilocarpina atua diretamente em células acinares de glândulas salivares e age sobre receptores muscarínicos no sistema nervoso central. Experimentos eletrofisiológicos mostraram que a pilocarpina despolariza a membrana de neurônios do OSF. Os resultados sugerem que, quando periféricamente aplicada, a pilocarpina não atua apenas nas glândulas salivares como um efeito sialogogo, mas também evoca a sensação de sede, agindo sobre o centro controlador do fluido corporal e do equilíbrio no sistema central.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito da lesão eletrolítica do órgão subfornicial (OSF) sobre parâmetros salivares (fluxo salivar, o conteúdo proteico e eletrolítico da saliva) e cardiovasculares (pressão arterial e a frequência cardíaca).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ANIMAIS

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté – **Registro CEEA/UNITAU nº 010/08**, foram selecionados vinte ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus var. albinus*), todos da mesma linhagem, com peso aproximado de 250 a 300g, fornecidos pelo Biotério da Universidade de Taubaté. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e à ração balanceada.

### 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a execução deste experimento, todos os animais foram submetidos a experimentação progressiva, sendo mensurado os padrões salivatórios e cardiovasculares. Os animais passaram pelas Fases: Fase Inicial (F<sub>0</sub>) administração de solução salina, Fase I (F<sub>I</sub>) administração de pilocarpina intraperitoneal (Sigma Aldrich), adquirida na farmácia Santa Paula, Araraquara, SP, Brasil, Fase II (F<sub>II</sub>) “lesão fictícia” do OSF e Fase III (F<sub>III</sub>) lesão eletrolítica do OSF com a administração de pilocarpina em (F<sub>II</sub> e F<sub>III</sub>).

Para mensurar os padrões salivatórios e cardiovasculares, em todas as fases, os animais foram anestesiados com ketamina 50mg/Kg peso corporal (Cristália

produtos químicos farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil) e cloridrato de xylazina 2%, 10mg/Kg peso corporal (Anasedan-Vetbrands-Jacareí, SP, Brasil).

Foi respeitado o período de cinco dias entre a administração de drogas desde ( $F_0$ ) até ( $F_{III}$ ) e sua eliminação pelo organismo (a pilocarpina é metabolizada pelo fígado e excretada pelos rins, sendo que a meia-vida é aproximadamente de uma hora) Aromdee et al. (1999), assim como o efeito da “lesão fictícia” ( $F_{II}$ ) e lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ).

#### Fase Inicial ( $F_0$ ): Controle

Nesta fase, foi realizada a administração intraperitoneal de solução salina em vinte animais, na dose 0,15M NaCl (padronização internacional) e para coletar a saliva, com os animais anestesiados, quatro bolas de algodão (Cremer, Blumenau, Santa Catarina, Brasil) pesando aproximadamente 20mg cada uma, foram colocadas na cavidade oral de cada animal, uma do lado direito, uma do lado esquerdo, e outras duas sob a língua. Após sete minutos (padronizado pela SBCAL- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), as bolas de algodão foram recolhidas e novamente pesadas em balança de precisão (Micronal - mod B200, São Paulo, São Paulo, Brasil). A diferença entre as pesagens demonstrou aumento do fluxo salivar (Figura 8).

Foram também determinados os componentes da salivares, e os parâmetros cardiovasculares, ou seja, a pressão arterial média (PAM) (Figura 10) e a frequência cardíaca (FC) (Figura 11).

#### Fase I ( $F_I$ ):

Nesta fase, foi realizada a administração intraperitoneal de pilocarpina em vinte animais, nas doses de 1, 2, 4, 8 e 16mg.Kg.mL<sup>-1</sup>, e medidos o fluxo salivar (Figura 2) e obtida a curva dose-resposta (Figura 8).



Figura 2 - Administração intraperitoneal de pilocarpina

#### Fase II (F<sub>II</sub>):

Nesta fase, os mesmos vinte animais, foram submetidos à “Lesão Fictícia” do OSF e após cinco dias do procedimento da “lesão” (padronizado pela SBCAL- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), foi realizada a administração intraperitoneal de pilocarpina na dose de 4,0mg.Kg.ml<sup>-1</sup> (dose padronizada internacionalmente como a dose efeito satisfatória para realização dos experimentos sem efeitos adversos) e determinados a secreção salivar (Figura 8) e os parâmetros cardiovasculares, ou seja, a pressão arterial média (PAM) (Figura 10) e a frequência cardíaca (FC) (Figura 11). O fluxo salivar foi medido pela diferença de peso das



bolas de algodão antes e após a embebição de saliva e quantificados a proteína total, a amilase, o cálcio, o sódio e o potássio da saliva (Tabela 1).

Fase III (F<sub>III</sub>):

Após cessados os efeitos decorrentes dos procedimentos executados na Fase II, (15 dias após a última administração de pilocarpina na Fase II) foi realizada nos mesmos vinte animais utilizados desde F<sub>0</sub>, uma lesão eletrolítica do OSF, e a injeção intraperitoneal de pilocarpina na dose de 4,0mg.Kg.ml<sup>-1</sup> e mensurado todos os padrões já mencionados no item Fase II (F<sub>II</sub>) (Figuras 8, 10 e 11).

Posteriormente foi avaliado o período de latência do efeito da lesão eletrolítica sobre o fluxo salivar, através da mensuração do fluxo salivar (Figura 9).

#### 4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA CANULAÇÃO

Na F<sub>II</sub>, para realização da canulação no OSF, os animais foram anestesiados com ketamina 50mg/Kg peso corporal (Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA, Itapira SP, Brasil) e cloridrato de xylazina 2%, 10mg/Kg peso corporal (Anasedan-Vetbrands-Jacareí, SP, Brasil) Já anestesiados, os animais foram posicionados em um aparelho estereotático, modelo 900 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA), e então realizada uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo da cabeça, afastamento do periósteo e exposição dos pontos craniométricos bregma e lambda que serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Em seguida foi realizada a trepanação da calvária com auxílio de uma broca esférica (Broca de aço esférica PM3- Maillefer) tomando-se o cuidado

para evitar lesão do seio sagital superior. Através desse orifício, com auxílio de uma agulha hipodérmica (Agulha Septoject XL 27 G Longa, Paris, França), foi introduzida uma cânula cujo processo resultou no que foi denominado de “lesão fictícia” do OSF. A localização da cânula foi obtida à partir dos parâmetros estereotáxicos obtidos pelo Atlas (Paxinos & Watson, 1986), ou seja, AP= 0,8mm posterior ao bregma; V= 4,2mm a partir da dura-máter; L= 0,0mm da sutura sagital, com inclinação de cinco graus. A cânula foi fixada à superfície do crânio com uso de resina acrílica autopolimerizável e auxílio de dois parafusos previamente posicionados na calvária.

Após o procedimento cirúrgico, uma dose de 50.000UI de penicilina (Pentabiótico, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, Brasil), foi administrada em cada animal.



Figura 3 - Procedimento de canulação do animal, com auxílio de aparelho estereotáxico

#### 4.4 LESÃO ELETROLÍTICA

Para a execução da lesão eletrolítica ( $F_{III}$ ), os animais foram novamente anestesiados da mesma forma descrita no item 4.3 e levados ao aparelho estereotáxico modelo 900 (David Kopf Instruments, USA). Após o eletródo ter sido introduzido no OSF através da cânula anteriormente posicionada, foi realizada uma lesão eletrolítica, pela passagem de uma corrente elétrica de 1,0mA por 15 segundos, utilizando uma fonte de corrente contínua.

#### 4.5 FLUXO SALIVAR

Em todas as Fases ( $F_0$ ,  $F_I$ ,  $F_{II}$ ,  $F_{III}$ ) a coleta da saliva, foi obtida com os animais anestesiados, através de quatro bolas de algodão (Cremer, Blumenau, Santa Catarina, Brasil) pesando aproximadamente 20mg cada uma, introduzidas na cavidade oral de cada animal, uma do lado direito, uma do lado esquerdo, e outras duas sob a língua. Após sete minutos (padronizado pela SBCAL- Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), as bolas de algodão foram recolhidas e novamente pesadas em balança de precisão (Micronal - mod B200, São Paulo, São Paulo, Brasil). A diferença entre as pesagens demonstrou aumento do fluxo salivar.

Em seguida, e após a estimulação do fluxo salivar com auxílio de injeção intraperitoneal de pilocarpina  $F_I$ ,  $F_{II}$ ,  $F_{III}$ , na dose de  $4\text{mg.Kg.mL}^{-1}$ , foi realizada nova coleta da saliva por sete minutos. Posteriormente, as bolas de algodão foram recolhidas e novamente pesadas em balança de precisão. A diferença entre as pesagens demonstra aumento do fluxo salivar (Figura 8).



Figura 4 – Animais posicionado para procedimento de coleta de saliva após anestesia e injeção intraperitoneal de pilocarpina

## 4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

a) A amilase salivar foi determinada pelo método Caraway modificado;

Método amiloclástica, onde a amilase hidrolisa o amido liberando moléculas de açúcares, e adicionando iodo ocorre a formação de cor azul com o amido não hidrolisado. A atividade da amilase é inversamente proporcional de cor azul e é calculada em comparação com um controle de substrato. Valores de referência: Soro 60 a 160U/dL

b) As proteínas totais foram determinadas pelo método Bradford modificado;

O método é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação

entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595nm.

- c) O sódio e o potássio foram determinados pelo método fotometria de chama utilizando o fotômetro de chama IL 143 (Lexington, Massachussettes USA);

A fotometria de chama é uma das análises laboratoriais clássicas e fornece com grande precisão e facilidade de operação. A concentração de íons alcalinos em amostras biológicas e o conhecimento dos valores do sódio e do potássio permite avaliar a intensidade dos desvios metabólicos observados em algumas condições. Faixa de medição em análises clínicas: para "K" de 0 a 9,9mmol/L- "Na " de 0 a 199 mmol/L, p/outras aplicações "K" entre 0 100ppm, "Na" de 0 a 100ppm.

- d) O cálcio foi determinado pelo método Cresolftaleína.

Método O-cresolftaleína-complexona (CFC), reagentes para a determinação do cálcio , somente diagnóstico em vitro. Em pH alcalino o cálcio reage com CFC formando um complexo molecular de cor púrpura, cuja intensidade de cor é proporcional á concentração do cálcio presente na amostra e possui absorção máxima em 570nm.

#### 4.7 REGISTROS DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Os valores de Pressão Arterial Média (PAM) e Freqüência Cardíaca (FC) de todos os animais ( $F_o$ ,  $F_{II}$ ,  $F_{III}$ ) foram registrados utilizando um tubo de polietileno PE-10 (Mantac Indústria e Comércio Ltda Me., Joinvile, Santa Catarina, Brasil). Com os animais anestesiados, o tubo de polietileno PE-10 foi introduzido na artéria femoral atingindo a parte abdominal da Aorta, e este tubo PE-10 foi conectado a um transdutor de pressão Statham P23 Db (Gould-Statham, Oxnard, CA, USA) e acoplado a um registrador de múltiplos canais (PowerLab Multirecord –Power Lab 4/25T, ADInstruments, Australia), que permitiu o registro dos dados cardiovasculares e através de gráficos foram comparado os valores.

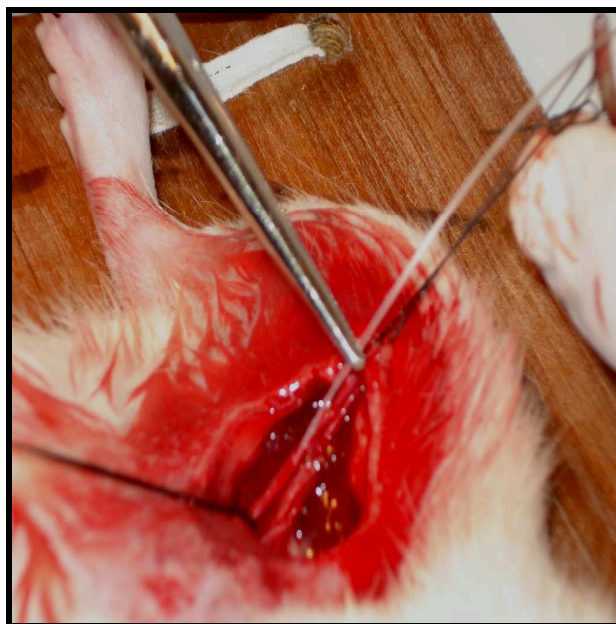


Figura 5 - Introdução de cânula Polietileno PE 10 na artéria femoral

#### 4.8 HISTOLOGIA

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com ketamina 80 mg/Kg peso corporal + 10mg/Kg do peso corporal de cloridrato de xylazina 2%,

levando os animais ao óbito e comprovado o estado cadavérico, o encéfalo foi removido da caixa craniana. Secções frontais de vinte a trinta micromêtros imediatamente antes e após o local da introdução da cânula foram obtidas em micrótomo de congelação e submetidas à rotina histológica para confirmação do local da lesão através de microscopia óptica, aumento de 10x. Somente os animais com lesão confirmada do OSF através de procedimento histológico é que foram submetidos a análise estatística.

O número de animais com lesão confirmada, pode ser verificada na parte superior das colunas nas figuras 9,10 e 11.

Os resultados foram apresentados como erro padrão da média e foram analisados pela ANOVA para múltipla comparação entre grupos. Para avaliação da interação entre fatores (lesão/droga/efeito) foi utilizado o teste de Newman post-hoc ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A figura 6 apresenta uma fotomicrografia do encéfalo de um animal com a indicação (seta) do local onde foi realizada a lesão no OSF. A lesão destruiu o OSF.

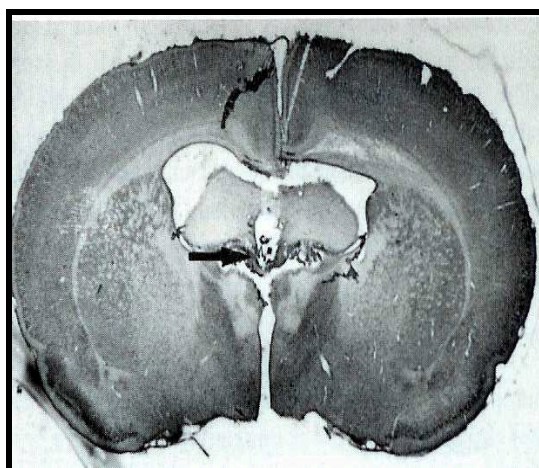
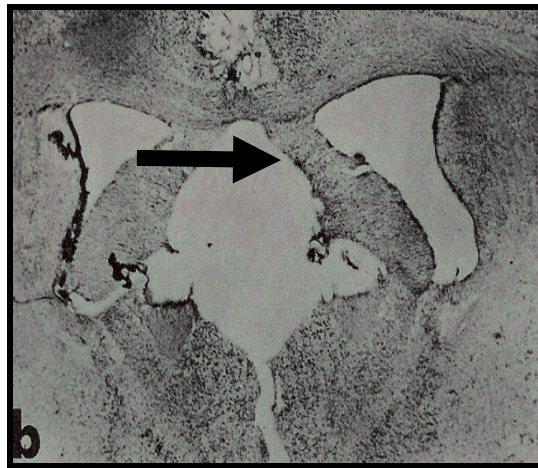
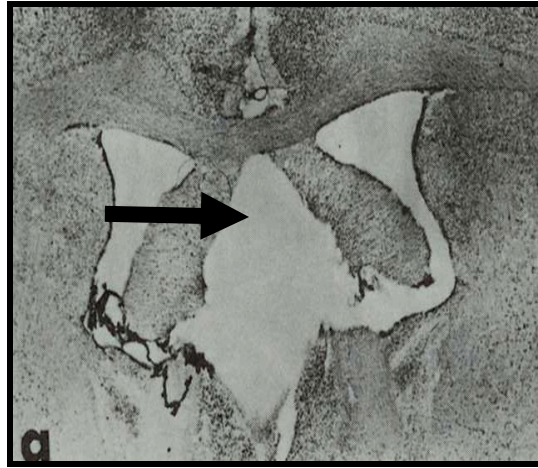


Figura 6 - Fotomicrografia do encéfalo de rato, mostrando a lesão no OSF (flecha), aumento de 10x

Nas figuras 7a, 7b, 7c, 7d podem ser observadas fotomicrografias de cortes seriados e sequenciais do encéfalo de um dos animais submetidos à lesão do OSF, nos parâmetros Antero- posterior 0,8 a 0,85mm posterior ao bregma, local de introdução da cânula.





Figuras 7a e 7b - Lesão completa do OSF no sentido ântero-posterior (flechas). Coordenada ântero-posterior AP 0,8 -0,85mm caudal ao bregma

## 5.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (1, 2, 4, 8, 16MG.KG.ML<sup>-1</sup>) NO FLUXO SALIVAR DE RATOS (F<sub>I</sub>) E COM "LESÃO FICTÍCIA" DO OSF (F<sub>II</sub>)

Nos animais controles (F<sub>0</sub>) em que foi injetada solução salina isotônica (0,15M NaCl), o fluxo salivar ficou em torno de  $19 \pm 2,0$  mg/7min em média.

A injeção intraperitoneal de pilocarpina (1, 2, 4, 8, 16mg.Kg.ml<sup>-1</sup>) nos ratos(F<sub>I</sub>) induziu aumento da curva dose dependente no fluxo salivar com valores de  $40 \pm 12$ ,

91±13, 292±10, 379±21, 479±24mg/7min, respectivamente. A ANOVA mostrou diferença estatisticamente significativa entre as doses ( $p<0.01$ ). A “lesão fictícia” do OSF ( $F_{II}$ ) não produziu alteração estatisticamente significativa do fluxo salivar quando comparado com os valores observados nos animais ( $F_I$ ) (Figura 8).

### 5.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (1, 2, 4, 8, 16MG.KG.ML<sup>-1</sup>) NO FLUXO SALIVAR DE RATOS COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF ( $F_{III}$ ) COMPARADO AOS RATOS ( $F_I$ ) E ( $F_{II}$ )

Nos animais controle ( $F_0$ ) em que foi injetada salina isotônica, o fluxo salivar ficou em torno de 19±2,0 mg/7min. A injeção intraperitoneal de pilocarpina (1, 2, 4, 8, 16mg.Kg.ml<sup>-1</sup>) nos ratos com lesão do OSF ( $F_{III}$ ) produziu severa redução na curva dose-dependente do fluxo salivar: 15±9, 22±10, 48±13, 133±16 e 151±17mg/7min quando comparado com o  $F_I$  e  $F_{II}$ , com diferença significativa ( $p<0.01$ ) (Figura 8).

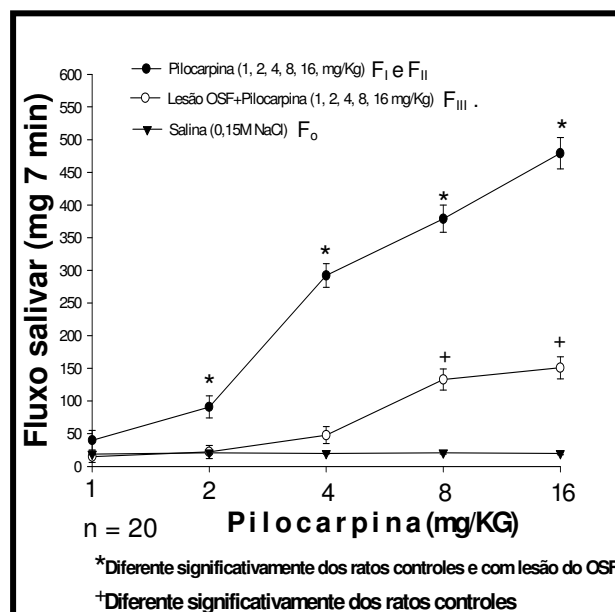


Figura 8 - Efeito da injeção intraperitoneal de pilocarpina (1, 2, 4, 8, 16mg.Kg.mL<sup>-1</sup>) no fluxo salivar de ratos controle sem e com lesão do OSF. Os resultados estão apresentados em média ±EPM

#### 5.4. FLUXO SALIVAR DE RATOS CONTROLE ( $F_0$ ), COM “LESÃO FICTICIA” DO OSF ( $F_{II}$ ) E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF ( $F_{III}$ ) APÓS ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA ( $4\text{MG.KG.ML}^{-1}$ )

Os resultados demonstraram que a lesão eletrolítica do OSF determinou redução do fluxo salivar provocado pela pilocarpina em um período que variou de cinco a 15 dias comparado com os ratos nas Fases  $F_0$  e  $F_{II}$ . Após o 15º dia, houve total recuperação do fluxo salivar nos animais com lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) estatisticamente significativa (Figura 9).

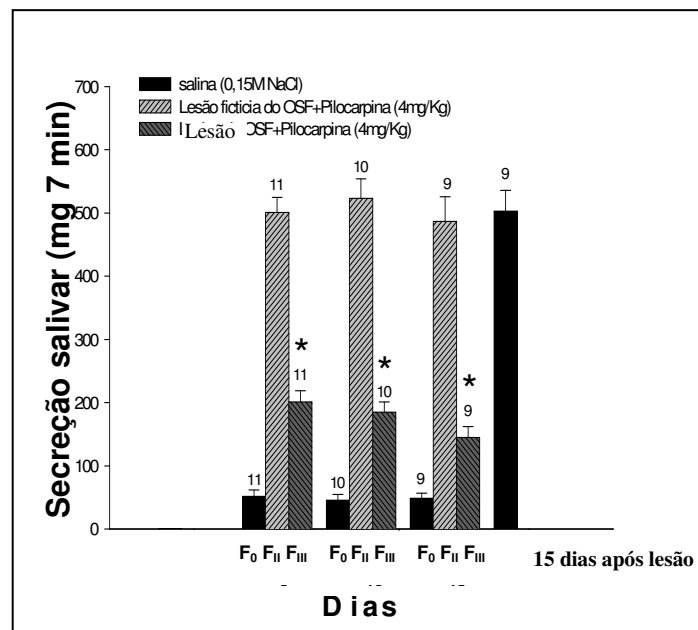


Figura 9 - Secreção salivar de ratos controle ( $F_0$ ), com “lesão fictícia” do OSF ( $F_{II}$ ) e com lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) após injeção intraperitoneal de solução salina e pilocarpina ( $4\text{mg/Kg}$  do peso corporal), no intervalo de cinco dias entre as coletas. Os resultados representam a média. O número de animais está acima das barras. \*Diferente dos controles e com “lesão fictícia” do OSF. ( $p < 0.05$ )

#### 5.5. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA ( $4\text{MG.KG.ML}^{-1}$ ) NO FLUXO SALIVAR E NOS COMPONENTES PROTEICOS E ELETROLÍTICOS DA SALIVA DOS ANIMAIS ( $F_0$ ) E COM “LESÃO FICTICIA” DO OSF ( $F_{II}$ )

### 5.5.1 Fluxo salivar

A aplicação intraperitoneal de pilocarpina na concentração de  $4\text{mgKg}^{-1}$  de peso corporal provocou aumento do fluxo salivar ( $503\pm 31\text{mg}\cdot 7\text{min}^{-1}$ ) dos animais com “lesão fictícia” do OSF ( $F_{II}$ ) quando comparado ao fluxo salivar dos animais controle ( $F_0$ ) ( $19\pm 2\text{mg}\cdot 7\text{min}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ). Foi estatisticamente significante (Figura 9 e Tabela 1).

### 5.5.2 Proteína total

Após aplicação intraperitoneal de pilocarpina nos ratos com “lesão fictícia” do OSF ( $F_{II}$ ) a proteína total aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) ( $7,3\pm 0,32\text{mg Kg}^{-1}$ ) em relação ao controle ( $F_0$ ) ( $5,9\pm 0,22\text{mg Kg}^{-1}$ ) (Tabela 1).

### 5.5.3 Amilase salivar

A administração intraperitoneal de pilocarpina nos animais com “lesão fictícia” do OSF ( $F_{II}$ ) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a amilase salivar ( $842\pm 11,0\text{Uml}^{-1}$ ) em relação ao controle ( $F_0$ ) ( $821\pm 6,9\text{Uml}^{-1}$ ) (Tabela 1).

### 5.5.4 Cálcio

A administração intraperitoneal de pilocarpina nos ratos com “lesão fictícia” do OSF (F<sub>II</sub>) não determinou alteração significativa a concentração de cálcio na saliva ( $3,98 \pm 0,18 \text{mEq.l}^{-1}$ ) quando comparado ao controle (F<sub>0</sub>) ( $3,12 \pm 0,14 \text{mEq.l}^{-1}$ ) (Tabela 1).

### 5.5.5 Sódio e potássio

A administração intraperitoneal de pilocarpina nos animais com “lesão fictícia” do OSF (F<sub>II</sub>) aumentou a concentração salivar de sódio ( $6,99 \pm 0,3 \text{mEq.l}^{-1}$ ) quando comparado ao controle (F<sub>0</sub>) ( $5,99 \pm 0,3 \text{mEq.l}^{-1}$ ). Quando realizada a injeção intraperitoneal de pilocarpina nos ratos com “lesão fictícia” do OSF (F<sub>II</sub>), a concentração de potássio aumentou, o que foi estatisticamente significante ( $16,6 \pm 0,5 \text{mEq.l}^{-1}$ ) quando comparado ao controle (F<sub>0</sub>) ( $12,32 \pm 0,3 \text{mEq.l}^{-1}$ ) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1- Efeito da pilocarpina ( $4 \text{mg.Kg.ml}^{-1}$ ) no fluxo salivar, no conteúdo proteico e eletrolítico da saliva em animais controle (F<sub>0</sub>) e com “lesão fictícia” do OSF (F<sub>II</sub>)

Tratamento	Taxa do Fluxo mg/7min	Proteína Total (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amilase (U ml <sup>-1</sup> )	Cálcio (mEq l <sup>-1</sup> )	Sódio (mEq l <sup>-1</sup> )	Potássio (mEq l <sup>-1</sup> )
F <sub>0</sub>	19±2,0	5,9±0,22	821±6,9	3,12±0,14	5,99±0,3	12,32±0,3
F <sub>II</sub>	503±31*	7,3±0,32*	842±11,0*	3,98±0,18	6,99±0,3*	16,6±0,5*

Estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) da fase controle

## 5.6. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA ( $4\text{MG.KG.ML}^{-1}$ ) NO FLUXO SALIVAR E NOS COMPONENTES PROTÉICOS E ELETROLÍTICOS DA SALIVA DOS ANIMAIS ( $F_0$ e $F_I$ ) E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF ( $F_{III}$ ) TABELA 2

### 5.6.1 Fluxo salivar

Após realização da lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) foi observada redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) do fluxo salivar ( $177 \pm 17\text{mg.7min}$ ) em relação ao fluxo induzido pela administração intraperitoneal de pilocarpina de ratos controle ( $F_I$ ) ( $501 \pm 24\text{mg.7min}$ ) ( Figura 9 e Tabela 2)

### 5.6.2 Proteína total

Após administração intraperitoneal de pilocarpina nos animais ( $F_I$ ), a proteína total da saliva aumentou ( $7,3 \pm 0,32\text{mgKg}^{-1}$ ) em relação ao controle ( $F_0$ ) ( $5,9 \pm 0,22\text{mg Kg}^{-1}$ ). A lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) provocou redução estatisticamente significativa da proteína total da saliva ( $3,3 \pm 0,12\text{mg/7min}$ ) (Tabela 2).

### 5.6.3 Amilase salivar

A administração intraperitoneal de pilocarpina nos animais ( $F_I$ ) aumentou a amilase salivar ( $849 \pm 8,1 \text{ U ml}^{-1}$ ) quando comparado com o controle ( $F_0$ ) ( $821 \pm 6,9 \text{ U ml}^{-1}$ ). Entretanto, a lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) reduziu significativamente a amilase salivar ( $711 \pm 6,8 \text{ U ml}^{-1}$ ). Foi estatisticamente significativa (Tabela 2).

#### 5.6.4 Cálcio

A administração intraperitoneal de pilocarpina nos animais ( $F_I$ ) ( $3,98 \pm 0,18 \text{ mEq l}^{-1}$ ) e a lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) ( $3,98 \pm 0,18 \text{ mEq l}^{-1}$ ) não alterou de forma significativa a concentração de cálcio na saliva dos animais quando observada na fase ( $F_0$ ) ( $3,12 \pm 0,14 \text{ mEq l}^{-1}$ ) (Tabela 2).

#### 5.6.5 Sódio e potássio

A administração intraperitoneal de pilocarpina aumentou a concentração salivar de sódio dos animais ( $F_I$ ) ( $7,0 \pm 0,2 \text{ mEq l}^{-1}$ ) quando comparado ao controle ( $F_0$ ) ( $5,99 \pm 0,3 \text{ mEq l}^{-1}$ ). Entretanto, a lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) reduziu estes valores ( $3,4 \pm 0,1 \text{ mEq l}^{-1}$ ). A concentração de potássio aumentou com a injeção intraperitoneal de pilocarpina nos animais ( $F_I$ ) ( $15,4 \pm 0,7 \text{ mEq l}^{-1}$ ) em relação ao controle ( $F_0$ ) ( $12,32 \pm 0,3 \text{ mEq l}^{-1}$ ), e reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) com a lesão

eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ) ( $9,5 \pm 0,33 \text{ mEq l}^{-1}$ ) quando comparado ao controle ( $12,32 \pm 0,30 \text{ mEq l}^{-1}$ ) (Tabela 2).

Tabela 2- Efeito da pilocarpina (4mg/Kg/1ml) no fluxo salivar, no conteúdo proteico e eletrolítico da saliva em animais controle ( $F_0$ ), sem lesão eletrolítica do OSF( $F_{II}$ )e com lesão eletrolítica do OSF( $F_{III}$ )

Tratamento	Taxa do Fluxo mg/7min	Proteína Total (mg Kg <sup>-1</sup> )	Amilase (U ml <sup>-1</sup> )	Cálcio (mEq l <sup>-1</sup> )	Sódio (mEq l <sup>-1</sup> )	Potássio (mEq l <sup>-1</sup> )
$F_0$	19±2,0	5,9±0,2	821±6,9	3,12±0,14	5,99±0,30	12,32±0,3
$F_I$	501±24*	7,3±0,32*	849±8,1*	3,98±0,18	7,0±0,2*	15,4±0,7 *
$F_{III}$	177±17*	3,3±0,12*	711±6,8*	3,98±0,18	3,4±0,1*	9,5±0,33*

\*Estatisticamente significante  $p < 0,05$

### 5.7.EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML<sup>-1</sup>) NA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) DE RATOS CONTROLE ( $F_0$ ), COM “LESÃO FICTÍCIA” DO OSF ( $F_{II}$ ) E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF ( $F_{III}$ )

A injeção intraperitoneal de pilocarpina nos ratos com “lesão fictícia” do OSF ( $F_{II}$ ) aumentou a PAM ( $32 \pm 6 \text{ mmHg}$ ) quando comparado grupo controle ( $F_0$ ) ( $8 \pm 3 \text{ mmHg}$ ). Quando realizada a lesão eletrolítica do OSF ( $F_{III}$ ), o efeito hipertensor da pilocarpina reduziu chegando próximo ao valor do grupo controle ( $F_0$ ) ( $9 \pm 4 \text{ mmHg}$ ) (Figura 10).



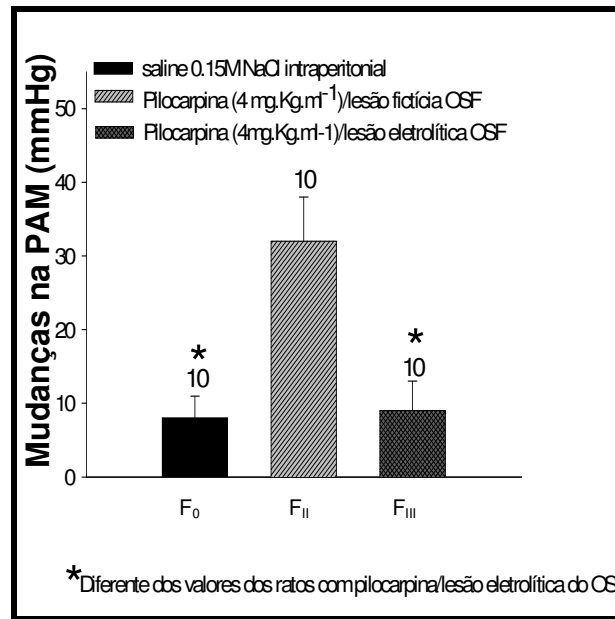


Figura 10- Efeito da injeção intraperitoneal de pilocarpina (4mg.Kg.mL<sup>-1</sup>) na pressão arterial média (PAM) de ratos controle (F<sub>0</sub>), com “lesão fictícia” do OSF (F<sub>II</sub>) e com lesão eletrolítica do OSF (F<sub>III</sub>). Os valores representam a média  $\pm$ EPM. O número de animais está representado no topo de cada coluna. (Newman’s post hoc test)

### 5.8. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE PILOCARPINA (4MG.KG.ML<sup>-1</sup>) NA FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) DE RATOS CONTROLE (F<sub>0</sub>), COM “LESÃO FICTÍCIA” DO OSF (F<sub>II</sub>) E COM LESÃO ELETROLÍTICA DO OSF (F<sub>III</sub>)

A injeção intraperitoneal de pilocarpina na dose de 4mg.Kg.mL<sup>-1</sup> reduziu a FC dos animais com “lesão fictícia” do OSF(F<sub>II</sub>) (223 $\pm$ 23bpm) quando comparado aos animais controle (F<sub>0</sub>) (311 $\pm$ 19bpm). Já a lesão eletrolítica do OSF (F<sub>III</sub>), aumentou a FC (310 $\pm$ 18bpm) (Figura 11).

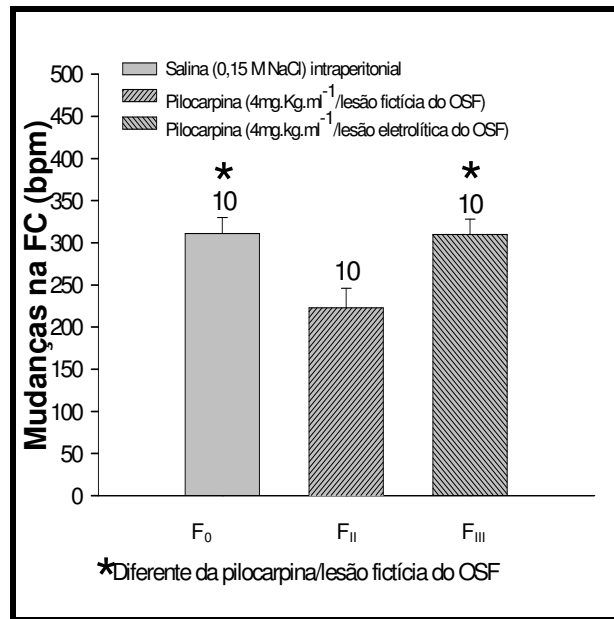


Figura 11 - Efeito da injeção intraperitoneal de pilocarpina ip (4mg.Kg.mL<sup>-1</sup>) na frequência cardíaca (FC) de ratos controle (F<sub>0</sub>), com "lesão fictícia" do OSF (F<sub>II</sub>) e com lesão eletrolítica do OSF (F<sub>III</sub>). Os valores representam a média±EPM. O número de animais está representado no topo de cada coluna.\*p<0.005 diferente da pilocarpina/lesão fictícia do OSF. (Newman's post hoc test)

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 FLUXO SALIVAR

A injeção intraperitoneal de pilocarpina aumentou o fluxo salivar que foi reduzido após efetuada a lesão eletrolítica do OSF. A redução foi aguda e persistiu por 15 dias. Após o 15º dia da lesão do OSF, o fluxo salivar retornou aos padrões normais demonstrando neuroplasticidade. A lesão do OSF possibilita sensibilização das glândulas parassimpatectomizadas (Emmelin, 1987). Outra possibilidade está relacionada com a plasticidade neuronal do sistema nervoso central envolvido no controle do fluxo salivar induzido pela pilocarpina, alterando temporariamente a sede e a natriurese induzida pela estimulação colinérgica (Saad et al., 2003)

Recentemente foi demonstrado que a pilocarpina injetada no OSF altera o fluxo salivar de forma dose dependente. Saad et al. (2007) verificaram que uma dose de  $4.0\text{mg.Kg.mL}^{-1}$  produzia um fluxo salivar médio e que quando a pilocarpina era injetada intra-cérebro ventricular, o fluxo salivar apresentava níveis significativamente diferentes do controle (Renzi et al., 1993; Saad et al., 1999).

A ingestão de água tem menor período de latência quando a pilocarpina é injetada centralmente do que quando periféricamente. A aplicação sistêmica de pilocarpina induz o fluxo salivar por atuar diretamente na glândula parótida e também atua centralmente induzindo a sede. Estes resultados são importantes para a compreensão do mecanismo desenvolvido quando a pilocarpina é usada para tratamento da boca seca (Sato et al., 2006).

Os resultados do trabalho demonstraram a participação do OSF na regulação das glândulas salivares no que diz respeito ao fluxo e conteúdo da saliva. A pilocarpina injetada sistemicamente, penetra no encéfalo atuando em receptores muscarínicos e ativando fibras eferentes autônomas, induzindo à salivação (Takakura et al., 2003).

Experimentos eletrofisiológicos usando cortes e registros celulares mostraram que a pilocarpina despolariza as membranas celulares dos neurônios do OSF e inibe a condução em sinapse -inibitórias gabaérgicas por ação pré-sináptica (Saad et al., 2007). Estes mecanismos sugerem que a pilocarpina não atua somente nas glândulas salivares como sialogogo, mas também induz a sensação de sede em decorrência de sua ação nos centros nervosos que controlam o fluxo salivar no organismo. Um estudo recente demonstrou que a pilocarpina atua nas glândulas salivares provocando secreção salivar (Inenaga et al., 2008).

Saad et al. (2007) observaram que a lesão do OSF provocava redução drástica do fluxo salivar induzido pela pilocarpina sistêmica, concluindo que o OSF é muito mais efetivo do que a área pré-óptica mediana (APOM) na regulação central da secreção salivar.

A ação de neurônios do OSF em outros sítios centrais foram estudados por Lind & Johnson (1982), Mangiapane & Simpson (1980) e Mckinley (1992) também demonstraram eferências do OSF para áreas cerebrais.

Possivelmente, a pilocarpina, alcalóide este que se difunde da circulação para o parênquima, ativando receptores colinérgicos presentes no diencéfalo, como o OSF ou áreas conectadas ao OSF, liberando neurotransmissores e atuando nas fibras de associação ou nos próprios corpos celulares do OSF. Posteriormente, deve

sinalizar para os núcleos salivatórios do bulbo que controlam as descargas autônomas para as glândulas salivares (Saad et al., 2007).

Pelos resultados obtidos no experimento de Saad et al. (2007), a administração sistêmica da pilocarpina permite que a mesma alcance o OSF e sinalize para os núcleos salivatórios do bulbo que devem lançar descargas autônomas para as glândulas salivares

A reorganização de circuitos neuronais centrais com redistribuição de funções entre áreas centrais como o OSF, pode ser explicada pela recuperação do fluxo salivar pela pilocarpina ou pela liberação sistêmica de algum agente colinomimético capaz de, quando necessário, induzir a salivação.

## 6.2 CONTEÚDO PROTEICO E ELETROLÍTICO DA SALIVA

A pilocarpina pode induzir o aumento do fluxo salivar e de componentes da saliva em ratos (Kuijper & Kramer, 1975). Após a aplicação intraperitoneal de pilocarpina em ratos com lesão fictícia do OSF, a proteína total da saliva aumentou, assim como a amilase salivar e a concentração de sódio e potássio. Por outro lado, não foi verificada alteração da concentração de cálcio.

O aumento da concentração de sódio e potássio na saliva decorrente da aplicação intraperitoneal de pilocarpina, provavelmente estimula o mecanismo de reabsorção e secreção de sódio e potássio, respectivamente, no ducto das glândulas salivares. Estudos experimentais demonstraram que pilocarpina altera a

concentração salivar de proteína total, amilase, sódio e potássio, mas não do cálcio. Além da angiotensina e aldosterona influenciarem o nível do cálcio orgânico, outros mecanismos, ainda não bem definidos, como a pilocarpina, também parecem ter alguma atuação (MacDougall et al., 1984).

Kuijper & Kramer (1975) observaram que a pilocarpina induzia maior secreção de proteínas pelas células acinares que pelas células do ducto glandular. Isso nos leva a pensar que a pilocarpina corrige anormalidades das glândulas salivares, regulando o fluxo da saliva, bem como sua composição eletrolítica.

O OSF também está intimamente ligado com a regulação eletrolítica do plasma. Em indivíduos com xerostomia, a concentração de eletrólitos na saliva total parece ocorrer mais em razão da hipossalivação do que da taxa de secreção (Chezzi et al., 2000).

O transporte ductal de eletrólitos está bem desenvolvido no estágio pós-natal, mas a liberação do fluido e de proteínas é menor que em adultos e requer a total maturação morfológica das células acinares. Os resultados deste estudo mostraram que a pilocarpina estimula o fluxo salivar e o conteúdo proteico e eletrolítico da saliva em ratos com lesão fictícia do OSF. Sendo assim, a pilocarpina pode ser utilizada para estimular a secreção salivar e o conteúdo proteico e eletrolítico da saliva em indivíduos tratados com antidepressivos (Kopittke et al., 2005).

Outro achado deste estudo foi o aumento da amilase salivar produzido pela pilocarpina.

Como pudemos observar, o OSF tem papel importante no fluxo salivar e nos componentes da saliva, possivelmente por emitir eferentes neuronais para diversas outras áreas circunventriculares que controlam os núcleos salivatórios via sistema nervoso autônomo.

### 6.3 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

A hipertensão essencial é uma das desordens mais comuns que afetam a saúde humana. A angiotensina II (ANGII) encefálica cumpre importante papel no desenvolvimento da hipertensão (Mangiapane & Simpson, 1980; Muratani et al., 1993; Wong & Chan, 1994). No OSF existe um sistema pressor angiotensinérgico, que fez aumentar a PAM e reduzir a FC quando realizada a injeção intraperitoneal de pilocarpina (Saad et. al., 2007).

A pilocarpina pode atuar de duas maneiras quando injetada sistemicamente:

- a) ativando os gânglios autônômicos, com liberando adrenalina na circulação;
- b) atuando via plasmática em áreas do sistema nervoso central que estão livres da barreira hematoencefálica, como é o caso do OSF e de outras estruturas importantes para o controle de fluidos corporais (Saad et al., 1998).

Nossos estudos revelaram que a pilocarpina administrada na dose de  $4\text{mg.Kg.mL}^{-1}$ , além de induzir modificações no fluxo e conteúdo salivar em ratos com lesão fictícia do OSF, causou alteração na PAM e FC e, a lesão do OSF aboliu o efeito da pilocarpina. Ficou demonstrado em trabalhos anteriores que a pilocarpina, quando injetada no núcleo pré-optico mediano (MnPO), além de aumentar a secreção salivar em ratos com “lesão fictícia” do OSF, elevou a PAM e reduziu a FC, com importante participação do óxido nítrico ON (Saad et al., 2003). Esta região recebe neurônios eferentes do OSF, como pode ser observado na figura 1, cuja lesão aboliu os efeitos da pilocarpina sobre o fluxo salivar, PAM e FC. Nossos resultados são corroborados por Takakura et al. (2005) que verificaram que a lesão

eletrolítica da região OSF abolia o efeito silogogo e o efeito hipertensor da injeção intraperitoneal de pilocarpina.

A ativação de receptores muscarínicos localizados no sistema cardiovascular produz vasodilatação e hipotensão, enquanto a ativação de receptores muscarínicos centrais induz à vasoconstricção e à resposta pressora, possivelmente por ativação simpática e liberação de vasopressina (Takakura et al., 2005). Desta forma, a pilocarpina administrada sistemicamente pode atingir o OSF que é livre da barreira hematoencefálica. O mecanismo ativado centralmente pela pilocarpina é desativado pela lesão do OSF, deixando intacto somente o mecanismo periférico responsável pela hipotensão nos animais com lesão do OSF. Foi demonstrado por Takakura et al. (2005) que a pilocarpina induz vasodilatação na glândula salivar, ainda que a mesma não dependa do OSF. Com relação à frequência cardíaca, neste estudo, foi observada bradicardia ligada ao aumento da PAM nos ratos com lesão fictícia do OSF. Acreditamos que a bradicardia pode ser reflexa (bradicardia reflexa-pressorreceptores do centro vaso motor bulbar), devido ao aumento da PAM ou ainda à ação da pilocarpina diretamente no coração. A lesão do OSF reduziu os efeitos da pilocarpina sobre a FC e estes resultados estão de acordo com o relato de Saad et al. (2003) de que o OSF tem vias eferentes para a região AV3V que comanda as regiões centrais e outras áreas do sistema nervoso autônomo, e áreas diencefálicas ligadas ao OSF.

Os resultados também podem ser justificados pela capacidade indutora da salivação que a pilocarpina apresenta ao agir em áreas do SNC que carecem da barreira hematoencefálica tal como o OSF. Adicionalmente, a pilocarpina induz o aumento da pressão arterial por atuar diretamente em receptores colinérgicos, liberar ANGII ou ativar o sistema nitrérgico, atuando provavelmente na liberação de



arginase que compete com o óxido nítrico sintetase sobre a arginina, bloqueando a produção de óxido nítrico, com conseqüente aumento da pressão arterial, bradicardia reflexa e hipossalivação. Em razão disso, acreditamos que o OSF exerça mecanismo regulatório do conteúdo e do fluxo salivar bem como do balanço cardiovascular. As alterações cardiovasculares podem estar ligadas a liberação ou inibição do óxido nítrico como demonstrado por Saad et al. (2003).

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

a) o OSF é uma estrutura do SNC que está ligada ao controle do fluxo salivar e dos componentes protéicos e eletrolíticos da saliva;

b) a pilocarpina produziu um aumento do fluxo salivar, observando-se a curva dose-dependente desde  $1\text{mg.Kg.mL}^{-1}$  até a dose de  $16\text{mg.Kg.mL}^{-1}$ ;

c) a injeção intraperitoneal de pilocarpina além de aumentar o fluxo salivar, aumentou a concentração de proteínas totais, amilase salivar, sódio e potássio, mas não alterou de forma significativa a concentração de cálcio;

d) a injeção intraperitoneal de pilocarpina na dose de  $4\text{mg.Kg.mL}^{-1}$ , em ratos com “lesão fictícia” do OSF (F<sub>II</sub>) aumentou a PAM e reduziu a FC;

e) a lesão eletrolítica do OSF (F<sub>III</sub>) reduziu o efeito hipertensor e bradicárdico da pilocarpina além de reduzir os efeitos da pilocarpina no fluxo e componentes da saliva.

## REFERÊNCIAS

1. Flynn FW, Evey LA, Mitchell JC. Heat-induced saliva secretion and thermoregulation in female rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Physiology Behavior* 1981; 26: 779-782
2. Matsuo R, Yamamoto, T. Gustatory – salivary reflex : neural activity of sympathetic and parasympathetic fibers innervating of submandibular gland of the hamster. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1989; 26: 187 -197.
3. Jensen JL, Brodin P, Berg T. Parotid secretion of fluid amylase and kallikrein during reflex stimulation under normal conditions and after acute administration of autonomic blocking agents in man. *Acta Physiologica Scandinavica* 1991; 143: 321–329.
4. Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol* 1993; 75: 186-191.
5. Freitas MJM, Renzia A, De Luca Jr LA. Remoção das glândulas salivares-Parótida e Total- e ingestão de NaCl em ratos. In: 9º Reunião Anual da FESBE; 1994; Caxambu-MG. Resumos. Caxambu: FESBE;1994. p O.
6. Scully C. Salivary glands and saliva number 10 drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Diseases* 2003; 9: 165–176.
7. Kopittke L, Gomez R, Barros HMT. Opposite effects of antidepressants on unstimulated and stimulated salivary flow. *Archives of Oral Biology* 2005; 50: 17-21.
8. Puy CL. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E449-E455.
9. Neville BW, Dam DD. patologia oral & maxilofacial. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 356.
10. Fox PC, Van der Ven PC, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ. Xerostomia: evaluation of the symptom with increasing significance. *J. Am.Dent. Assc* 1985; 110: 519-525.

11. Wiseman LR, Faulds D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. *Drugs* 1995; (49): 143-155.
12. Takakura ACT, Moreira TS, Laitano SC, De Luca JR LA, Renzi A, Menami JV. Central muscarinic receptors signal pilocarpine-induced salivation. *J Dent Res* 2003; 82 (12): 993-997.
13. Gotrick B, Akerman S, Ericson D, Torstenson R, Tobin G. Oral pilocarpine for treatment of opioid-induced oral dryness in healthy adults. *J Dent Res* 2004; 83 (5): 393-397.
14. Sato N, Ono K, Honda E, Haga K, Yokota M, Inenaga K. Pilocarpine-induced salivation and thirst in conscious rats. *J Dent Res* 2006; 85 (1): 64-68.
15. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996 p.1014..
16. Mangiapane ML, Simpson JB. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am. J. Physiol* 1980; 239: R382-R389.
17. Lind RW, Johnson AK. Subfornical organ-median preoptic connections and drinking and pressor responses to angiotensin II. *J. Physiol* 1982; 228: 295-301.
18. Thunhorst RL, Erlich KJ, Simpson JB. Subfornical organ participates in salt appetite. *Behav. Neurosci* 1990; 104: 637-642.
19. Yang H, Lu D, Raizafa MK. Lack of cross talk between  $\alpha_1$ -adrenergic and angiotensin type 1 receptors in neurons of spontaneous hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 27: 1277-1283.
20. Chezzi EM, Lange LA, Ship FA. Determination of variation of stimulated salivary flow rates. *J. Dental Res* 2000; 79: 1874-1878.
21. Nagler R, Marmry Y, Fox PC, Baum BJ, Har-El R, Chevion M. Irradiation-induced damage to salivary gland. *Radiation Research* 1997; 147: 468-476.
22. Hughes CV, Baum BJ, Fox PC, Marmary Y, Yeh CK, Sonies BC. Oral- pharyngeal dysphagia: a common sequela of salivary gland dysfunction. *Dysphagia* 1987; 1: 173-177.

23. Abollahi M, Radfar R. Current opinion on drug-induced oral reactions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice* [ serial on line] 2008 [ cited 2008 sept 20]; 9 (3): 1-32. Disponível em:URL: <http://www.thejcdp.com>.
24. Myoshi H. *Semiologia das glândulas salivares*. [ serial on line] [cited 2008 sept 22 ]. Disponível em:URL:<http://www.textolivre.com.br/joomla/index.php?option=comcontent&task=view&id=6903&Itemid=37>
25. Ohlin R, Perek C. Salivary secretion of the major sublingual glands of the rats. *Experientia* 1965; (21): 408.
26. Templeton D, Thulin A. Secretory motor and vascular effects in the sublingual gland of the rat caused by autonomic nerve stimulation. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 1978; (63): 59-66.
27. Garrett JR, Anderson NLC. Rat sublingual salivary glands; secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. *Archives of Oral Biology* 1991; 36: 675-683.
28. Norberg KA, Olson L. Adrenergic innervation of salivary glands in the rat. *Zeitschrift für Zellforschung* 1965; (68): 183-189.
29. Martinez JR, Cassity N. Salivary secretion induced from isolated, perfused rat submandibular glands by sympathomimetic agents. *Archives of Oral Biology* 1983; 28: 1101-1108.
30. Elverdin JC, Fortis MAL, Stefano FJ, Perek CJ. Alpha-1adrenoceptors mediate secretory responses to norepinephrine in innervated and denervated rat submaxillary glands. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1984; 229: 261-266.
31. Baum BJ. Neurotransmitter control of secretion. *Journal of Dental Research* 1987; 66: 628-632.
32. Izumi H, Karita K. Low-frequency subthreshold sympathetic stimulation augments maximal reflex parasympathetic salivary secretion in cats. *American Journal of Physiology* 1995; 268: 1188–1195.

33. Emmelin N. Nerve interactions in salivary glands. *Journal of Dental Research* 1987; 66: 509-517.
34. Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. *Journal of Dental Research* 1987; 66: 387-397.
35. Parkinson D. Cholinergic receptors. In: Loewy AD, Spyer KM. *Central regulation of autonomic functions*. Oxford: University Press Oxford; 1990, p. 28-43.
36. Izumi H, Karita K. Parasympathetic-mediated reflex salivation and vasodilatation in the cat submandibular gland. *American Journal of Physiology* 1994; 267: 747-753.
37. Hiramatsu Y, Eckelman WC, Carrasquillo JA, Miletich RS, Valdez IH, Kurrasch RH, et al. Analysis of muscarinic receptors in human brain and salivary gland in vivo. *American Journal of Physiology* 1995; 268: 1491- 1499.
38. Budavari S, editor. *Merck. Index Merck of chemicals, drugs, and biologicals*. New Jersey: Merck & Co; 1989.
39. Zelles T, Blazsek J, Keleman E. Analysis of the effectiveness of pilocarpine in management of xerostomia. *Ogorvosi Szemle* 1990; (83): 319-321.
40. Renzi A. Papel do sistema nervoso central no controle da secreção salivar induzida pela injeção periférica ou central de pilocarpina em ratos [Tese de doutorado]. Araraquara: Universidade Paulista, Faculdade de Odontologia, 1994.
41. Hoss W, Woodruff JM, Ellerbrock BR, Perivasamy S, Ghodsi-Hovsepian S, Stibbe J, et al. Biochemical and behavioral responses of pilocarpine at muscarinic receptor subtypes in the CNS. Comparison with receptor binding and low-energy conformations. *Brain Reserch Bulletin* 1990; 553: 232–238.
42. Renzi A, Colombari E, Mattos Filho TR, Silveira JE, Saad WA, De Luca Jr LA, et al. Involvement of the central nervous system in salivary secretion induced by pilocarpine in rats. *J. Dent. Res* 1993; (72): 1481-1484.
43. Saad WA, Camargo LAA, Guarda RS, Pereira AF, Simões S. Effect of injection of L-NAME on drinking response. *Braz. J. Med. Biol. Res* 1999; 32: 1413-1416.

44. Rhodus NL. Oral pilocarpine HCL stimulates labial (minor) salivary gland flow in patients with Sjögren's syndrome. *Oral Diseases* 1997; 3: 93-98.
45. Kuijper LAH, Kramer MF. Rate of protein synthesis in rat salivary gland cells after pilocarpine or feeding. I. Rate of (glyco) protein secretion from cells of mixed salivary glands. *Cell lissue Res* 1975; 164: 435-446.
46. Nagler MR, Nagler A. The effect of pilocarpine on salivary constituents inpatients with chronic graft-versus-host- disease. *Arch. Oral Biol* 2001; 46: 689-695.
47. Saad WA, Camargo LA, Silva-Netto CR, Rodriguea JA, Covian MR. The control of sodium chloride intake: functional relationship between hypothalamic inhibitory areas and amygdaloid complex stimulating areas. *Brain. Res. Bull* 1981;(6): 117-202.
48. Vale CF, Camargo GMPA, Saad WA, Menami JV, Renzi A, Luiz AC, et al. Effect of ibotenate lesions of the Ventromedial hypothalamus on the water and salt intake induced by activation of The median proptic nucleus in sodium- depleted rats. *J. Auton Nerv Syst* 1997 Sept; 66 (1-2): 19-25.
49. Saad WA, Camargo LAA, Rodrigues JA, Simões S. Effect of eletrolytic and chemical lesion by ibotenic acid of the septal area on water and salt intake. *Brain. Res. Bull* 1998; (47): 163-169.
50. Cecanho R, Anaya M, Renzi A, Menami JV, De Luca Jr LA. Sympathetic mediation of salivation induced by intracerebroventricular pilocarpine in rats. *J. Aut. Syst* 1999; 76: 14.
51. Saad WA, Guarda IF, Camargo LA, Santos TAFB, Saad WA. Functional relationship between subfornical organ cholinergic stimulation and nitreergic activation influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Regul Pept* 2007 Oct 4;143(1-3): 28-33.
52. Mckinley M. Common aspects of the cerebral regulation of thirst and renal sodium excretion. *Kidney Int* 1992; 41: S102- S106.
53. Hubschle T, Mckinley MJ, Oldfield BJ. Efferent connections of the lamina terminalis, the preoptic area and the insular cortex to submandibular and sublingual gland of the rat traced with pseudorabies virus. *Brain Res* 1998; 806: 219-231.


54. Saad WA, Gaurda IMFS, Camargo LAA, Santos TAFB, Gaurda RS, Saad WA, et al. Role of nitric oxide of the median preoptic nucleus (MnPO) in the alterations of salivary flow, arterial pressure and heart rate induced by injection of pilocarpine into the MnPO and intraperitoneally. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003; 36: 897-905.
55. Almeida A, Antunes VR, Saad WA, Camargo LAA. Effects of the alpha antagonist and agonist injected into lateral hypothalamus on the water and sodium intake induced by injection of angiotensin II in the subfornical organ. *Brain Res. Bull* 1999; 48: 525-555.
56. MacDougall JG, Johnson EI, Coglán JP, Denton DA, Scoggins BA, Wright RD. Calcium antagonists and stimulus-secretion coupling of aldosterone. *J. Hypertens.* 1984; (2Suppl): S 531.
57. Simon E. Interface properties of circumventricular organs in salt and fluid balance. *News in Physiological Sciences* 2000 Apr; 15 (2): 61-67.
58. Matsumura K, Simon E. Locations and properties of angiotensin II-responsive neurones in the circumventricular region of the duck brain. *J Physiol* 1990; 429: 281-296 .
59. Pastuskovas CV, Cassel MD, Johnson AK, Robert L. Effects of water deprivation and rehydration on c-Fos and FosB staining in the rat supraoptic nucleus and lamina terminalis region. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2003; 284: 1119-1125.
60. Cottrell GT, Ferguson AV. Sensory circumventricular organs: central roles in integrated autonomic regulation. *Elsevier Regulatory Peptides*, 2003; 117: 11–23.
61. Collister JP, Hendel MD. Subfornical organ lesion attenuates chronic hypotensive effects of losartan in salt-replete rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4 (4): 207-212.
62. Starbuck EM, Fitts AD. Differential effects of intravenous hyperosmotic solutes on drinking latency and c-Fos expression in the circumventricular organs and hypothalamus of the rat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2003 July 1; (1): R14-R18.



63. Fitts DA, Freece JA, Bebbler JEV, Zierath DK. Effects of forebrain circumventricular organ ablation on drinking or salt appetite after sodium depletion or hypernatremia. *American Journal of Physiology* 2004; 6 (2): 1325-1334.
64. McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News in Physiological Sciences* 2004 Feb; 19 (1): 1-6.
65. Takakura AC, Moreira TS, De Luca LA Jr, Renzi A, Menani JV, Colombari E. Effects of AV3V lesion on pilocarpine-induced pressor response and salivary gland vasodilation. *Brain Res* 2005 Sep 7; 1055(1-2): 111-121.
66. Noda M, Hiyama TY. Sodium-level-sensitive sodium channel and salt-intake behavior. *Chemical Senses* 2005; 30(Supplement 1): i44-i45.
67. Inenaga K, Wakasugi-Sato N, Ono K, Hirase M, Honda E. Intraperitoneal injection of pilocarpine activates neurons in the circumventricular organs and hypothalamus in rats. *Brain Res* 2008 Mar 20; 1200: 51-57.
68. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press; 1986.
69. Aromdee C, Ferguson MM, Ledger R, Wal J. A pilot study of the disposition of pilocarpine in plasma, saliva and urine after a single oral dose. *Eur J Pharm Sci*. 1999; 8: 81-83.
70. Muratani H, Ferrario CM, Averill DB. Ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II. *Am. J. Physiol* 1993; 246: R388-R395.
71. Wong TM, Chan YS. Role of cardiovascular neurons of rostral ventrolateral medulla in the genesis of hypertension. In: 19<sup>th</sup> Chinese Physiological Conference; 1994; China. Proceedings. China; 1994. p. 22.

## ANEXOS

### ANEXO A – Cópia da carta de aprovação pelo Comitê de Ética Institucional



Instituto Básico de Biociências  
Avenida Tiradentes, nº 500 – centro  
Cep: 12030-180 - Taubaté/SP  
Tel/Fax: 3629-7909 - tel: 3629-2319  
[ibb@unitau.br](mailto:ibb@unitau.br) e [institutoibb@unitau.br](mailto:institutoibb@unitau.br)

### DECLARAÇÃO

Dec. nº 025/08

Registro CEEA/UNITAU nº 010/08 (esse nº de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto).

**Projeto de Pesquisa:** "Lesão do órgão subfornical e sua influência no fluxo salivar e componentes da saliva".

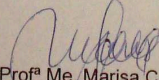
**Pesquisador Responsável:** Prof. Me. Talmir Augusto F. B. Santos

**Apresentar relatório final ao término da pesquisa:** dezembro/2008.

O Comitê de Ética para Experimentação Animal, em reunião de 03/11/2008 e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP Nº 362/2003, considerou o Projeto acima **aprovado**.

Este Comitê recomenda que a dose de anestésico utilizada seja 10mg/kg de cloridrato de xilazina 2% e 25 a 50mg/kg de ketamina base.

Taubaté, 03 de novembro de 2008.





Profª Me. Marisa Cardoso  
Coordenador do Comitê de Ética para Experimentação Animal  
Universidade de Taubaté

ANEXO B – Publicação relacionada a tese apresentada para obtenção do Título de Doutor pelo programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté

Copyright © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Functional relationship between subfornical organ cholinergic stimulation and nitrenergic activation influencing cardiovascular and body fluid homeostasis**

**Wilson Abrão Saad<sup>a, b, c, e,</sup>  , Ismael Francisco Motta Siqueira Guarda<sup>d</sup>, Luis Antonio de Arruda Camargo<sup>c, e</sup>, Talmir Augusto Faria Brisola dos Santos<sup>a</sup> and William Abrão Saad<sup>f</sup>**

<sup>a</sup>Basic Institute of Biosciences-UNITAU, Taubaté, SP, Brazil

<sup>b</sup>Department of Exact and Natural Science UNIARA Araraquara SP, Brazil

<sup>c</sup>Department of Physiology and Pathology School of Dentistry, Paulista State University, UNESP Araraquara, SP, Brazil

<sup>d</sup>Department of Anesthesiology Clinic Hospital State of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup>Department of Physiology, Federal University of São Carlos, SP, Brazil

<sup>f</sup>Departamento of Gastrology Clinic Hospital State of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 20 September 2006;

revised 21 December 2006;

accepted 31 January 2007.

Available online 3 March 2007.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Talmir Augusto Faria Brisola dos Santos

Taubaté, junho de 2009.