ANA CAROLINA ROMERO

**Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos induzida
por 5/6 de nefrectomia**

São Paulo

2013

ANA CAROLINA ROMERO

**Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos induzida
por 5/6 de nefrectomia**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

São Paulo

2013

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Romero, Ana Carolina.

Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos induzida por 5/6 de nefrectomia / Ana Carolina Romero ; orientador Fernando Neves Nogueira. -- São Paulo, 2013.

73 p. : il.: fig. , tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Saliva - Alteração. 2. Rim - Patologia. 3. Insuficiência renal crônica. 4. Manifestações bucais. I. Nogueira, Fernando Neves. II. Título.

Romero AC. Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos induzida por 5/6 de nefrectomia. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico esta dissertação a Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por TUDO, pois sei que sem Ele nada seria possível e é graças a Ele que cheguei até aqui.

Gostaria de agradecer toda minha família. Aos meus pais, Vagner Antônio Romero e Ester da Silva Romero. Pai, obrigada por tudo, por sempre ser um exemplo de caráter, sempre me ensinar, incentivar em relação aos estudos e me apoiar em todas as minhas decisões. Mãe, muito obrigada por tudo, obrigada por sempre me apoiar, encorajar nos momentos de fraqueza e indecisão, pelas suas orações e por me ensinar a ser corajosa e lutar para conquistar meus objetivos; Minha irmã Paula pela amizade e parceria nos momentos bons e principalmente nos difíceis. Enfim, aos meus avós, tios, tias, primos, primas e agregados que sempre me apoiaram, torceram e encorajaram.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira por sempre acreditar em mim e na minha capacidade; agradeço pela parceria, explicações, conselhos e por ter aceitado trabalhar com questões que não são sua linha principal de pesquisa e mesmo assim ter “abraçado a causa” desde o início. Muito obrigada!!

À Professora Dra Cássia Bergamaschi do departamento de fisiologia da UNIFESP, por abrir as portas do seu laboratório, por ter me ensinado a técnica de 5/6 de nefrectomia, sem a qual esse trabalho não poderia ser realizado, além de seus sábios conselhos durante o período que estive na UNIFESP e também no meu exame de qualificação. Agradeço também aos alunos do seu laboratório por toda ajuda no período que estive lá. Muito obrigada!!

Ao professor Dr. José Nicolau pelos ensinamentos e sabedoria nos momentos de seminário, nos cafezinhos e pelas sugestões de leituras que sempre me fizeram olhar tudo de forma mais crítica e auxiliaram a finalizar esta dissertação.

À professora Dra Alyne Simões Gonçalves pelos conselhos e explicações principalmente nos momentos de seminários e pelo auxílio na utilização do ICP e ao Professor Dr. Victor Elias Arana-Chaves pela utilização do biotério do laboratório de biologia oral, sem o qual esta pesquisa não poderia ser realizada.

Ao Douglas Nesadal, técnico do laboratório e amigo, pela paciência, sabedoria, calma, carinho e prontidão em explicar questões relacionadas aos animais de experimentação e aos experimentos. Sua ajuda e conselhos foram essenciais para a conclusão deste trabalho, muito obrigada por tudo!!

Agradeço à amiga de graduação e pós-graduação Danielle Carvalho. Dani, só posso agradecer pela companhia em todos os momentos nesse período. Lavamos gaiolas juntas, dividimos por incontáveis horas a sala de cirurgia do biotério, fizemos relatórios, disciplinas, choramos juntas, mas rimos muito mais! Sem você teria sido bem mais difícil, muito obrigada por tudo!

À Flávia Ibuki, minha irmã mais velha de pós-graduação. Flá, muito obrigada pela companhia, por sempre estar disposta a me ajudar, pelos conselhos, risadas, enfim, muito obrigada por tudo!

Aos grandes amigos: Thiago, Aline, Débora, Bruna, Igor e Fábio pelo companheirismo, apoio em todos os momentos, conversas sempre regadas com muitas risadas e enfim, agradeço a Deus por ter amigos tão especiais

como vocês. Muito obrigada por tudo! Observação: Thiago Cesar Ramalho, obrigada por modificar a imagem dos 5/6 de nefrectomia!

Aos colegas de pós-graduação do departamento de biomateriais e biologia oral, em especial a todas as alunas do Laboratório de Biologia Oral pelo apoio e carinho.

Ao Departamento de Biomateriais e Biologia Oral pelo apoio e auxílio em muitas questões relacionadas ao projeto, além da oportunidade de conviver com grandes professores e pesquisadores.

À Rosinha (Rosa Cristina Nogueira), Eli (Elidamar Clementino Guimarães) e Edi (Edeleine Aparecida Mário) pelo carinho, amizade e muitas orientações.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos concedida.

Tão somente esforça-te, e tem bom ânimo. Josué 1:18

RESUMO

Romero AC. Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos induzida por 5/6 de nefrectomia [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

A saliva é um fluido produzido e secretado pelas glândulas salivares. Ela desempenha um importante papel na homeostase dos indivíduos. Diversas doenças afetam a produção ou a composição da saliva secretada, dentre elas a doença renal crônica (DRC). A DRC é definida como um dano renal ou diminuição da função renal por um período igual ou superior a três meses. É classificada em estágios, sendo que em seu grau mais avançado existe a necessidade de terapias de hemodiálise ou transplante renal. Muitos são os estudos que buscaram manifestações orais, alterações de fluxo e composição salivares nestes pacientes, contudo quando buscamos na literatura, não encontramos trabalhos que utilizaram um modelo animal para o estudo de parâmetros de composição salivar na doença renal crônica. O objetivo deste estudo foi analisar alterações em alguns componentes na saliva de ratos estimulada por pilocarpina (1mg/Kg) ou isoproterenol (5mg/Kg), em um modelo de 5/6 de nefrectomia (IRC), comparando com um grupo controle positivo (Sham) e outro controle negativo (C) em dois tempos experimentais de 8 e 12 semanas. A nefropatia crônica foi obtida com 5/6 de nefrectomia pela ligadura de dois ramos da artéria renal esquerda e nefrectomia total direita e os grupos Sham foram submetidos à simulação do procedimento cirúrgico. Ao final dos tempos experimentais, amostras de sangue e saliva foram coletadas de todos os grupos e foram analisados: fluxo salivar, concentração de proteína total, atividades das enzimas amilase e peroxidase, ácido siálico livre e total, bem como as dos íons: cálcio, fósforo, sódio, potássio e concentração de ureia salivar. Foram analisadas também as concentrações séricas de ureia e creatinina. Observamos aumento significativo das concentrações séricas de ureia e creatinina e das concentrações salivares de ureia nos grupos IRC em ambos os tempos experimentais; Com estímulo de pilocarpina, observamos que com 8 semanas ocorreu diminuição significativa da atividade da enzima

amilase e com 12 semanas ocorrem aumentos significativos da concentração de proteínas totais e atividade da enzima peroxidase. No estímulo com isoproterenol, observamos que com 8 semanas ocorrem diminuições significativas das atividades das enzimas amilase e peroxidase, com 12 semanas ocorreu diminuição significativa do fluxo salivar do grupo IRC em relação ao grupo Sham, aumento significativo da atividade da enzima amilase e diminuição significativa da atividade da enzima peroxidase no grupo IRC em relação aos grupos controle e sham. Concluimos que o período de 12 semanas pós-cirurgia apresentou maiores alterações da saliva coletada tanto pelo estímulo simpático quanto pelo estímulo parassimpático, devendo este período ser utilizado nas futuras análises em glândulas salivares.

Palavras-chave: Saliva. Ratos. Doença renal crônica. 5/6 de nefrectomia.

ABSTRACT

Romero AC. Salivary alterations in chronic renal dysfunction in rats induced by 5/6 nephrectomy [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Original.

Saliva is a fluid produced and secreted by the salivary glands. It plays an important role in the homeostasis of individuals. Several diseases affect the production or composition of saliva secreted, among them chronic kidney disease (CKD). CKD is defined as a kidney damage or decreased kidney function for a three months exceeding period. It is classified in stages, and in its most advanced level there is a need for hemodialysis therapies or kidney transplantation. Many studies have sought oral manifestations, changes in salivary flow and composition in these patients, however when we look at the literature, we did not found studies that used an animal model for the study of salivary composition in chronic kidney disease. The aim of this study was to analyze changes in some components in the saliva of rats stimulated by pilocarpine (1mg/Kg) or isoproterenol (5mg/kg) in a model of 5/6 nephrectomy (CRF), compared with a positive control group (Sham) and a negative control (C) at two time period of 8 and 12 weeks. The chronic nephropathy was obtained with 5/6 nephrectomy by ligation of two branches of the left renal artery and right radical nephrectomy and Sham groups underwent surgery simulation. At the end of the experimental period, blood and saliva samples were collected from all groups and were analyzed: salivary flow rate, total protein concentration, activities of amylase and peroxidase, free and total sialic acid, as well as the ions calcium, phosphorus, sodium, potassium and urea concentration in saliva. We also evaluate the serum concentrations of urea and creatinine. We observed a significant increase in serum urea and creatinine concentrations and salivary urea in IRC groups in both experimental times; Under pilocarpine stimulation, we found a significant decrease in the activity of the enzyme amylase 8 weeks after the surgery. 12 weeks after the surgery

increase in the total protein concentration and peroxidase activity were observed; Under stimulation with isoproterenol, we observed decreases in the activities of amylase and peroxidase after 8 weeks; 12 weeks after the surgery we found decrease in salivary flow compared to the sham group, increase in the activity of the enzyme amylase and decrease of the peroxidase activity in CRF group when compared to control and sham groups. We conclude that the period of 12 weeks after surgery showed greater changes in saliva collected both by sympathetic stimulation and by parasympathetic stimulation, and this period should be used in future analyzes in salivary glands.

Keywords: Saliva. Rats. Chronic Kidney Disease. 5/6 nephrectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Modelo experimental de indução da Nefropatia Crônica. (Imagem modificada) (Shimizu 2005)	35
Figura 4.2 - Esquema de distribuição dos grupos experimentais.....	36
Figura 5.1 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a concentração sérica de creatinina (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,63$ e $p=0,000$)	48
Figura 5.2 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,573$ e $p=0,000$)	49
Figura 5.3 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,48$ e $p=0,002$)	49
Figura 5.4 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a concentração sérica de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,733$ e $p=0,000$)	51
Figura 5.5 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,871$ e $p=0,000$)	52

Figura 5.6 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,645$ e $p = 0,000$)	52
Figura 5.7 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a atividade da enzima peroxidase ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = -0,549$ e $p = 0,000$).....	53
Figura 5.8 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a atividade da enzima peroxidase ($\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = -0,461$ e $p = 0,000$).....	53
Figura 5.9 - Correlação entre a concentração salivar de ureia (mg/dL) e o fluxo salivar ($\mu\text{l}/\text{ml}$) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = -0,386$ e $p = 0,004$).....	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 -Pesos corpóreo inicial e final dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/kg p.c.) nos tempos experimentais 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p<0,05$ 46
- Tabela 5.2 -Valores séricos de ureia e creatinina dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p<0,05$46
- Tabela 5.3 -Características salivares de fluxo e componentes proteicos dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p<0,05$47
- Tabela 5.4 -Características eletrolíticas da saliva dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p<0,05$48
- Tabela 5.5 -Pesos corpóreo inicial e final dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de Isoproterenol (5mg/kg p.c.) nos tempos experimentais 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p<0,05$50

Tabela 5.6 -Valores séricos de ureia e creatinina dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa $p<0,05$50

Tabela 5.7 -Características salivares dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa $p<0,05$51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	graus Celsius
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
DAG	diacilglicerol
DRC	doença renal crônica
g	gramas
IRC	insuficiência renal crônica
kDa	quilo Dalton
mg/dL	miligrama por decilitro
mL/min	mililitros por minuto
mmol/L	milimol por litro
N	normalidade
nm	nanômetros
TGF	taxa de filtração glomerular
µg	micrograma
µL/min	microlitros por minuto
µM/mL	micromol por mililitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	GLÂNDULAS SALIVARES E SALIVA	20
2.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA	25
2.3	DOENÇA RENAL CRÔNICA NA ODONTOLOGIA	29
3	PROPOSIÇÃO	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	ANIMAIS	34
4.2	INDUÇÃO DA NEFROPATIA	34
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS	36
4.3.1	Coleta das amostras de saliva	37
4.3.2	Coleta das amostras de sangue	37
4.4	ANÁLISES	37
4.4.1	Análises em amostras de saliva	37
4.4.1.1	<i>Fluxo salivar</i>	37
4.4.1.2	<i>Determinação da concentração de proteínas totais</i>	38
4.4.1.3	<i>Determinação da atividade enzimática da amilase</i>	38
4.4.1.4	<i>Determinação da atividade enzimática da peroxidase</i>	38
4.4.1.5	<i>Determinação da concentração de ácido siálico</i>	39
4.4.1.6	<i>Composição iônica</i>	39
4.4.1.7	<i>Concentração de ureia salivar</i>	40
4.4.2	Análises em amostras de soro	40
4.4.2.1	<i>Conteúdo sérico de creatinina pelo método Creatinina K</i>	40
4.4.2.2	<i>Conteúdo sérico de ureia pelo método ureia CE</i>	41
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5	RESULTADOS	42
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

As glândulas salivares são órgãos exócrinos responsáveis pela secreção salivar (Humphrey; Williamson, 2001). A saliva desempenha um papel importante na saúde oral devido às suas inúmeras funções e composição. Funções exercidas pela saliva na cavidade oral como manutenção do pH salivar próximo à neutralidade e também os processos de remineralização e maturação pós eruptiva dos dentes são devidas aos seus componentes inorgânicos. Outras funções como início do processo de digestão e formação de película adquirida ocorrem devido aos componentes orgânicos salivares (Nicolau, 2008). Tanto a composição quanto o fluxo salivar são dependentes de vários fatores, tais como: o ritmo circadiano, exposição à luz, grau de hidratação, tipo de estímulo, idade e sexo (Shannon, 1966; Heintze et al., 1983; Dawes, 1984). Outros fatores importantes que alteram a salivação são uma variedade de doenças sistêmicas como diabetes dos tipos 1 e 2, doenças auto imunes como a síndrome de sjögren, doença reumática e doença renal crônica; além do uso de medicações sistêmicas e particularmente radioterapia em tumores malignos de cabeça e pescoço (Tschope et al., 2010).

Muitos são os estudos que buscaram manifestações orais, alterações salivares e função de glândulas salivares acessórias em pacientes com doença renal crônica. Foram encontrados diminuição do fluxo salivar estimulado e não estimulado em pacientes submetidos à hemodiálise (Kho et al., 1999; Kao et al., 2000; Martins et al., 2006), alterações de pH e capacidade tampão (Kho et al., 1999), além de alterações na composição salivar de compostos orgânicos com o aumento da secreção de proteínas e redução da atividade da enzima peroxidase (Martins et al., 2006; Vesterinen et al., 2007) e inorgânicos com o aumento das secreções de fosfato, potássio, zinco, magnésio e ureia (Savica et al., 2008; Cardoso et al., 2009).

A doença renal crônica é definida como um dano ou diminuição da função renal por um período igual ou superior a três meses; é classificada em estágios que indicam a progressão de sua severidade, no seu grau mais

avançado, da insuficiência renal crônica, existe a necessidade de terapias de hemodiálise ou transplante renal (Levey et al., 2003).

Para o estudo das repercussões sistêmicas da doença renal crônica tem sido utilizado o modelo já bem estabelecido de indução da nefropatia crônica que submete os ratos à ablação de 5/6 da massa renal reduzindo progressivamente sua função (Purkerson et al., 1976; Bergamaschi et al., 1997; Sviglerova et al., 2010), contudo, quando buscamos na literatura, não encontramos trabalhos que utilizaram este modelo para o estudo das alterações de componentes salivares nesta doença, sendo este o foco deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLÂNDULAS SALIVARES E SALIVA

As glândulas salivares constituem um grupo de glândulas exócrinas localizadas na região da boca que são responsáveis pela secreção de seus produtos para a cavidade oral formando no conjunto a saliva. As glândulas salivares são classificadas em: glândulas salivares maiores, parótidas, submandibulares e sublinguais e glândulas salivares menores ou acessórias localizadas na submucosa oral, com exceção da gengiva e palato duro anterior. As glândulas salivares são constituídas por um parênquima com origem do ectoderma, formadas por unidades funcionais, denominadas adenômeros, constituídas por unidades secretoras terminais que podem ser serosas quando possuem organelas para síntese, armazenamento e secreção de proteínas, mucosas quando possuem organelas para produção de grandes cadeias de carboidratos e mistas, quando possuem as duas características. Nas glândulas parótidas existe o predomínio de células serosas, na sublingual de células mucosas e na submandibular a mistura dos dois tipos. Além de uma grande quantidade de adipócitos, outro tipo celular existente são as células mioepiteliais que exercem funções contráteis, contribuindo para o esvaziamento das unidades secretoras e do sistema de ductos. Os ductos salivares são os responsáveis pelo transporte e por modificações da composição salivar, sendo estes os ductos intercalares, estriados e excretores. Todas estas estruturas estão envoltas pelo estroma glandular, composto de tecido conjuntivo do tipo frouxo que possui os suprimentos sanguíneo, linfático e nervoso da glândula (Katchburian, 1999).

A saliva total é composta principalmente pela secreção das glândulas salivares e também pelo fluido gengival, microorganismos e restos alimentares. A saliva é rotineiramente classificada em: não estimulada e estimulada; sob condição não estimulada, aproximadamente 20% de saliva é derivada da parótida, 65% da submandibular, 7-8% das glândulas sublinguais e as glândulas salivares menores contribuem com cerca de 10% da saliva total. Sob

estímulo, a contribuição de cada glândula muda e a parótida passa a contribuir com mais de 50% da produção de saliva (Sreebny, 2000; Humphrey; Williamson, 2001).

Em indivíduos saudáveis a produção diária de saliva varia entre 0,5 a 1,5 litros e é composta por 99% de água e 1 % de componentes orgânicos e inorgânicos. Alguns componentes inorgânicos, eletrólitos, são: sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfato; os compostos orgânicos são uma grande variedade de proteínas como enzimas, imunoglobulinas e possui também produtos nitrogenados como uréia e amônia (Dodds et al., 2005).

Dentre as muitas funções da saliva, podemos citar: lubrificação dos tecidos orais, capacidade tampão, clearance, manutenção da integridade dental, atividade antibacteriana, paladar, digestão e do processo de remineralização dental (Humphrey; Williamson, 2001; Pedersen et al., 2002).

A alfa-amilase é a enzima mais característica da saliva, secretada principalmente pela glândula parótida, responsável pelo início da digestão dos polissacarídeos através da hidrólise da ligação glicosídica α 1-4, relacionada com a ação de proteção oral, modulando a aderência bacteriana. A amilase é considerada marcador de atividade glandular por constituir cerca de 40 a 50% das proteínas totais produzidas pelas glândulas salivares (Schenkels et al., 1995; Pedersen et al., 2002).

Estudos mostraram correlação entre a alfa-amilase salivar e o estresse físico e psicológico, mostrando aumento da concentração salivar da enzima com o aumento da ativação do sistema nervoso simpático, sugerindo que a mesma pode ser utilizada como marcador dos níveis basais plasmáticos de catecolaminas, principalmente a noradrenalina, que possui forte relação com o estresse (Rohleder et al., 2006; Nater; Rohleder, 2009).

A peroxidase é uma enzima presente em diversas secreções corpóreas como lágrima, secreção vaginal e saliva, secretada preferencialmente pelas glândulas parótida e submandibular, a níveis semelhantes em crianças e adultos (Tenovuo et al., 1987). Esta enzima é frequentemente citada como uma parte importante do sistema de defesa inato da mucosa catalisa a oxidação do tiocianato (SCN^-) para hipotiocianato (OSCN^-), na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado no metabolismo aeróbio bacteriano, principalmente por estreptococos, assim possui ação antioxidante por conferir

proteção contra espécies reativas de oxigênio que são tóxicas para diversos tipos celulares como fibroblastos gengivais e células epiteliais e possui também ação antibacteriana pela ação do hipotiocianato durante a formação do biofilme, certamente modificando a cariogenicidade do biofilme dental e diminuindo a infecção cruzada supragengival por patógenos periodontais (Ihalin et al., 2006; Ashby, 2008).

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que compõem cerca de 26% das proteínas secretadas e possuem suas propriedades bioquímicas e funcionais devido aos seus resíduos terminais, que podem ser entre outros: ácido siálico, galactose ou fucose; Elas controlam a permeabilidade da superfície da mucosa, a penetração de potenciais irritantes e tóxicas para as células, lubrificam, protegem contra dissecação, além de proteger contra a ação de proteases geradas pelas bactérias orais e regular a colonização da cavidade oral por bactérias, fungos e vírus. Dois tipos de mucinas estão presentes na saliva humana: glicoproteína mucina oligomérica (MG1) com massa molecular superior a 1000 kDa produzida preferencialmente pela glândula submandibular que tem como característica a aderência aos dentes e também a formação de complexos com outras proteínas salivares como as estaterinas e histatinas auxiliando na depuração de bactérias. A glicoproteína mucina monomérica (MG2) com massa molecular de 200-250 kDa é bastante eficaz na agregação bacteriana, levando à sua depuração. Apesar de contribuir com apenas 10% do volume total de saliva produzido, as glândulas salivares acessórias contribuem com cerca de 70% das mucinas produzidas e a ocorrência dos sintomas clássicos de xerostomia como: dor, ulceração e dificuldade na deglutição podem estar relacionados com a diminuição da produção das mucinas salivares (Leach, 1963; Tabak et al., 1982; Amerongen et al., 1995; Zalewska et al., 2000).

As glândulas exócrinas em mamíferos recebem uma dupla inervação por fibras adrenérgicas e colinérgicas; As fibras simpáticas pós-ganglionares se originam de corpos celulares localizados em gânglios pré-vertebrais; a inervação parassimpática consiste em fibras pós-ganglionares originárias de gânglios periféricos os quais, por sua vez, recebem as fibras pré-ganglionares do nervo facial (Martos et al., 1987).

A secreção salivar ocorre em resposta à estimulação autônoma de neurotransmissores simpáticos e parassimpáticos. A estimulação parassimpática é mediada principalmente pelo neurotransmissor acetilcolina que atua especialmente em receptores colinérgicos de membrana M_3 e em menor medida no M_1 , evocando a maior parte do fluido salivar secretado, gera graus variáveis de exocitose das células, responsável pela secreção de mucinas pelas glândulas mucosas, além disso, induz a contração das células mioepiteliais e aumenta o fluxo sanguíneo glandular como parte do reflexo salivar. Já o estímulo simpático é mediado principalmente pelo neurotransmissor noradrenalina que atua em receptores β -adrenérgicos, essencialmente em células recebendo estímulo parassimpático, o que tende a produzir um efeito sinérgico, mas exerce pouco efeito sobre a secreção das glândulas mucosas, muitas vezes não causa mobilização de muito líquido, mas não inibe a secreção salivar, possui a tendência de modular a composição salivar pelo aumento da exocitose de proteínas, também induz a contração das células mioepiteliais e exerce controle sobre o fluxo sanguíneo glandular (Proctor; Carpenter, 2007).

Explicando os mecanismos intracelulares da secreção salivar, sabemos que ambos, sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático (SNP), desencadearão a ativação de uma proteína de membrana, a proteína G. Se o estímulo for iniciado através da ligação de um neurotransmissor com um receptor β -adrenérgico, haverá aumento intracelular de cAMP, o qual ativará a proteína quinase A (PKA) dependente de cAMP, ocorrendo exocitose de proteínas. Se a estimulação for via receptor muscarínico-colinérgico é a enzima fosfolipase C que será ativada, o que acarretará em dissociação do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) em inositol 1,4,5 trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 , no citoplasma, se ligará ao receptor do retículo endoplasmático provocando a liberação de cálcio. Já o DAG permanecerá na membrana, ativará a proteína quinase C, que uma vez ativada se ligará com o complexo Ca^{2+} -Calmodulina levando também à exocitose de proteínas (Humphrey; Williamson, 2001; Turner; Sugiyama, 2002; Nicolau, 2008).

O modelo aceito de secreção de água e íons envolve a ativação de sistemas de transportes iônicos nas membranas basolaterais e apical dependente da concentração intracelular de Ca^{2+} , resultando em um

movimento iônico transcelular que gera um gradiente osmótico, o qual permite o movimento transepitelial de água para o lúmen formando a saliva primária. Posteriormente o conteúdo eletrolítico da saliva é modificado, principalmente com a remoção do cloreto de sódio durante a passagem através do sistema ductal até chegar à cavidade oral. A saliva é, por conseguinte, convertida a partir de uma solução isotônica a uma solução hipotônica em relação ao plasma, que auxilia a detecção de sal na dieta. Trata-se de um processo ativo com grande gasto de energia, o que explica a existência de uma grande quantidade de mitocôndrias na membrana basolateral das células dos ductos estriados. Além de remover, eles também adicionam os íons potássio e bicarbonato, importante componente do sistema tampão que protege os dentes contra o ataque dos ácidos produzidos pelas bactérias (Martinez, 1994; Proctor; Carpenter, 2007). A secreção de água ocorre também em grande parte por canais de membrana denominados aquaporinas, principalmente pelo subtipo 5 (Ishikawa; Ishida, 2000).

A pilocarpina é um agonista parassimpático com ação predominantemente muscarínica, bastante utilizada como sialogogo, causando uma produção contínua de saliva de natureza aquosa. A indução da secreção salivar em humanos ocorre com a ativação de canais de K^+ , pelo aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} via fosfolipase C e aumento da expressão proteica de aquaporinas 5 nas células acinares das glândulas parótidas e submandibulares (Li et al., 2006).

O isoproterenol é um potente agonista β -adrenérgico não seletivo com baixa afinidade por receptores α -adrenérgicos. Nas glândulas salivares atua promovendo o aumento dos níveis de AMPc, ativando a proteína quinase A (PKA) estimulando a secreção proteica (Baum et al., 1981).

Muitos fatores podem influenciar o fluxo salivar e a sua composição, sendo assim, a saliva possui composição diferente entre indivíduos e até mesmo no mesmo indivíduo em diferentes circunstâncias. Os fatores que alteram a salivação são principalmente: grau de hidratação, ritmo circadiano, exposição à luz, tipo de estímulo, nutrição, idade e sexo; além disso, condições que geram disfunção das glândulas salivares podem gerar alterações no seu produto de secreção. Condições temporárias como depressão, infecções glandulares ou efeitos colaterais por medicações, especialmente

antidepressivos, agentes anti-hipertensivos, diuréticos e anti-histamínicos podem causar xerostomia, sensação subjetiva de boca seca, que pode estar relacionada com a hipossalivação, diminuição do fluxo salivar, por atuarem nos receptores glandulares, principalmente muscarínicos (Sreebny; Schwartz, 1997). Além disso, a terapia de radiação de câncer de cabeça e pescoço induz danos irreversíveis no tecido das glândulas salivares resultando na hipofunção; condições autoimunes como a síndrome de sjögren, metabólicas como o diabetes dos tipos 1 e 2, neurológicas como paralisia cerebral, genéticas como síndrome de down e outras como a hipertensão e doença renal crônica geram alterações de fluxo ou composição salivar (Pedersen et al., 2002; Siqueira; Nicolau, 2002; Mata et al., 2004; Llena-Puy, 2006; Rodrigues Santos et al., 2007; Malinovsky et al., 2011).

2.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Os rins são parte integrante do sistema urinário e possuem muitas funções que contribuem para a homeostasia dos líquidos do corpo de várias maneiras, dentre elas a regulação do volume sanguíneo, regulação da pressão arterial, manutenção da osmolaridade do sangue, liberação de hormônios e excreção de resíduos como a ureia (proveniente do metabolismo de aminoácidos), a creatinina (originária da degradação da fosfocreatina muscular) e de substâncias estranhas produzidas pelo corpo ou ingeridas, como pesticidas, fármacos e aditivos alimentares (Tortora, 2002).

As doenças renais representam um grande problema de saúde pública mundial. Segundo o senso realizado no ano de 2006 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia existia na época dentre todos os graus de severidade da doença um total de 1,96 milhões de pacientes, ou seja, 1,87% da população adulta do Brasil (Sesso; Gordan, 2007). O senso de diálise realizado no ano de 2011 estima que o total de pacientes em tratamento dialítico seria de 91.314 pessoas no Brasil.

Nos Estados Unidos, existe uma crescente incidência e prevalência de todas as fases da doença renal, quase 8 milhões de pessoas (4% da

população adulta dos EUA) possuíam DRC moderada ou grave, e outros 450.000 possuíam o estágio final da doença renal em 2006. Esses números devem aumentar com o envelhecimento da população e a prevalência de doenças como diabetes e hipertensão, com a projeção para o ano de 2015 de alcançar pelo menos 600.000 pessoas em falência renal crônica (Weiner, 2007).

Várias doenças renais podem ser agrupadas em duas categorias principais: insuficiência renal aguda, na qual os rins param de funcionar abruptamente, total ou parcialmente, podendo recuperar a sua função e a doença renal crônica, na qual há perda progressiva e irreversível da função dos néfrons, diminuindo gradativamente a sua função (Guyton, 1997).

A doença renal crônica é definida como um dano ou diminuição da função renal por um período igual ou superior a três meses. Dano renal é definido pela presença de anormalidades patológicas ou marcadores dos danos observados em exames de sangue, urina ou por imagens indicando diminuição na taxa de filtração glomerular (TFG) (Soriano Cabrera; Nefrología, 2004).

A doença renal crônica é dividida em estágios que indicam a progressão da sua severidade, determinada pela redução da TFG; o estágio inicial (estágio 1) é caracterizado pela presença do dano renal sem alteração de sua função (TFG); o segundo estágio caracterizado pela presença do dano com o início da queda da TFG, sendo geralmente assintomático, porém existe um risco significativo de progressão da doença. Com o agravamento da doença, a função renal começa a se deteriorar (estágios 3 e 4). Eventualmente ocorre a Insuficiência Renal Crônica (estágio 5), necessitando de terapias de hemodiálise ou transplante renal (Foundation., 2002). Medidas de prevenção, detecção precoce através de exames de rotina e o tratamento da doença renal crônica nos seus estágios iniciais podem reduzir os resultados adversos desta doença (Levey et al., 2003).

Muitos são os fatores clínicos de risco desta doença, dentre eles podemos citar o diabetes, hipertensão, doenças autoimunes, infecções sistêmicas e no trato urinário, cálculo renal, obstrução do trato urinário, neoplasias, histórico familiar, exposição a certos medicamentos e baixo peso ao nascimento (Soriano Cabrera; Nefrología, 2004).

Dentre as alterações sistêmicas encontradas na doença renal crônica, as doenças cardiovasculares são conhecidas como causa importante de morbidade e mortalidade. Estudos com pacientes no estágio final da doença mostram que os mesmos possuem calcificações significantes nas artérias coronárias e aorta e aproximadamente 50% possuem calcificações valvulares (Hujairi et al., 2004).

A fisiopatologia da calcificação da parede vascular e das desordens na DRC é complexa e associada com anormalidades no metabolismo mineral, apresentando hiperfostatemia, hiperparatiodismo, hipocalcemia e deficiência de vitamina D (Shobeiri et al., 2010; Chauhan et al., 2012).

A incidência de complicações cardiovasculares, incluindo hipertensão, hipertrofia vascular esquerda, disfunções sistólica e diastólica, neuropatia autonômica e arritmia, é em média 20 vezes superior em comparação com a população normal, sendo que a falência cardíaca, doença isquêmica cardíaca ou morte súbita cardíaca são as principais causas de morte, representando cerca de 50% de todas as mortes na falência renal (Sviglerova et al., 2010).

A hipertensão é responsável pela ocorrência de proteinúria, o aumento da pressão glomerular leva ao aumento de sua permeabilidade e excessiva filtração de proteínas, as proteínas presentes na urina são tóxicas aos túbulos e podem provocar inflamação túbulointersticial (Guyton, 1997).

Para o estudo das repercussões sistêmicas da doença renal crônica tem sido utilizado o modelo já bem estabelecido desde 1932 por Chanutin e Ferres de indução da nefropatia crônica que submete os ratos à ablação de 5/6 da massa renal por ligadura de dois dos três ramos da artéria renal esquerda e nefrectomia total direita reduzindo progressivamente a função renal. Este modelo permite avaliar observações clínicas, dentro de um ambiente controlado, já que o modelo desenvolve a condição de uremia e as complicações da doença similares às condições humanas (Chanutin; Ferris, 1932; Bergamaschi et al., 1997; Sviglerova et al., 2010).

Com a diminuição da massa renal, os néfrons remanescentes sofrem hipertrofia funcional, bem como estrutural com adaptações na sua microcirculação levando ao aumento da taxa de filtração glomerular. A magnitude do aumento da taxa de filtração de cada néfron está diretamente relacionada com a massa renal perdida (Hostetter, 2001). Esta hipertrofia

funcional é considerada benéfica no sentido de minimizar a redução na taxa de filtração glomerular que poderia ocorrer, porém trabalhos mostram que ocorre uma destruição progressiva dos néfrons remanescentes por mecanismos não totalmente elucidados, com o aumento da permeabilidade dos capilares glomerulares às proteínas séricas e progressiva coagulação com eventuais trombozes nesses capilares, levando à hipertensão e à queda da taxa de filtração glomerular, gerando as complicações sistêmicas da uremia (Purkerson et al., 1976).

Trabalhos que utilizaram o método de 5/6 de nefrectomia permitiram investigar diversas alterações sistêmicas decorrentes da doença renal crônica e sua progressão.

Sabendo que o metabolismo e excreção de fármacos estão intimamente relacionados com as funções hepáticas e renais, existem na literatura relatos de alterações no metabolismo hepático em ratos nefrectomizados, mostrando uma diminuição significativa dos teores totais do citocromo P450 e das atividades de enzimas específicas em diferentes tempos experimentais, 21 dias (Uchida et al., 1995) e 45 dias (Leber et al., 1978).

Alterações significativas de parâmetros cardiovasculares foram identificadas 10 semanas após 5/6 de nefrectomia: hipertensão, elevação da frequência cardíaca de repouso, diminuição do tônus cardíaco parassimpático, hipertrofia do ventrículo esquerdo associado com o enfraquecimento da força de contração, prolongamento da contração e do relaxamento e o encurtamento da duração do potencial de ação (Sviglerova et al., 2010; Gava et al., 2012; Sviglerova et al., 2012).

Falando um pouco sobre as alterações metabólicas, sabemos que a falha de crescimento linear é um problema comum em crianças com insuficiência renal crônica e tem sido atribuída a uma série de fatores: distúrbio de água e eletrólitos, deficiência proteico-calórica, acidose metabólica, anemia e principalmente em distúrbios endócrinos, relacionados às alterações na regulação do hormônio de crescimento (GH) e o insulin-like growth factor-I (IGF-1) (Metzger et al., 1993; Buyan et al., 1995).

Estudos com animais mostraram alterações nos discos epifisários de ratos com graus severos de uremia, dentre eles: duração prolongada da fase hipertrófica dos condrócitos e também apresentam tamanho menor quando

comparados aos ratos controles, além disso, outros aspectos morfológicos como a desorganização do arranjo colunar e a irregularidade acentuada da interface osso/cartilagem metafisária sugerem que o estado de uremia interfere na maturação dos condrócitos (Santos et al., 2005).

A espessura do disco epifisário se mostrou reduzida, sendo também reduzidos os níveis de RNA dos receptores de paratormônio em ratos nefrectomizados com graus severos de hiperparatireoidismo secundário, níveis menores dos receptores do hormônio de crescimento e a diminuição da expressão de RNAm do IGF-1 (Hanna et al., 1995; Edmondson et al., 2000).

Estudos com ratos nefrectomizados mostraram o impacto da administração de hormônio de crescimento nos marcadores de diferenciação dos condrócitos de discos epifisários desses animais. De maneira geral, a administração exógena de hormônio de crescimento aumenta a espessura dos discos epifisários, tendo uma ação benéfica na maturação e aumento da proliferação dos condrócitos (Metzger et al., 1993; Edmondson et al., 2000; Barbosa et al., 2007).

A vasta utilização do modelo animal de 5/6 de nefrectomia mostra sua competência para entender melhor as alterações sistêmicas decorrentes da doença renal crônica, podendo ser de grande valia no entendimento das repercussões que ocorrem na cavidade oral.

2.3 DOENÇA RENAL CRÔNICA NA ODONTOLOGIA

A doença renal crônica é reconhecida como um problema crescente de saúde pública mundial, relacionada ao aumento das taxas de diabetes mellitus, obesidade, hipertensão e ao envelhecimento das populações (Caskey et al., 2011); portanto é necessário que seja do conhecimento dos profissionais da saúde de maneira geral incluindo os cirurgiões dentistas, a respeito das alterações sistêmicas e em cavidade oral que esses pacientes possuem, além dos cuidados especiais necessários no seu tratamento.

Muitos são os estudos que buscaram alterações e manifestações orais, alterações salivares e função das glândulas salivares em pacientes com doença renal crônica.

As principais alterações orais observadas em pacientes com falência renal crônica são: odor de ureia, xerostomia, alteração de paladar e dor em língua e ou mucosa (Kho et al., 1999; Kao et al., 2000). Gengivites e periodontites são achados comuns em pacientes sob-hemodiálise (Klassen; Krasko, 2002), sendo observada também grande prevalência de cálculo dental nestes pacientes (Naugle et al., 1998; Martins et al., 2012).

Em crianças com insuficiência renal crônica, foram observados atraso na erupção da dentição permanente, hipoplasia de esmalte nas dentições decídua e permanente podendo ou não apresentar coloração marrom, ocorrendo também estreitamento ou calcificação das câmaras pulpares de adultos com doença renal crônica, além da diminuição da incidência de cárie dentária (Kelly et al., 1980; Wolff et al., 1985; Levy, 1988; Jaffe et al., 1990; Kho et al., 1999; Ganibegovic, 2000; Al-Nowaiser et al., 2003).

Alterações ósseas são recorrentes em pacientes com DRC em decorrência das alterações metabólicas existentes, incluindo a diminuição da forma ativa da vitamina D, acidose, hiperfosfatemia e hipocalcemia que resultam no hiperparatireoidismo secundário. O hiperparatireoidismo pode se apresentar como um tumor maxilar castanho, um dos tumores de células gigantes que muitas vezes aparece como uma lesão osteolítica expansiva óssea, geralmente na mandíbula, costelas, pélvis e fêmur, sendo também observado o alargamento das bases ósseas dos maxilares (Okada et al., 2000; Tarrass et al., 2008).

Para avaliar alteração de função das glândulas salivares comparando pacientes sob-hemodiálise e pacientes controles, foi utilizado o método da cintilografia observando diminuição significativa desta função nos pacientes com alterações renais (Kao et al., 2000). Foi encontrado dano em DNA de glândulas salivares acessórias em pacientes sob-hemodiálise comparando com pacientes controles (Ersson et al., 2011) e a presença de atrofia em análises histológicas de glândulas salivares acessórias (Postorino et al., 2003).

Em relação à secreção salivar, estudos descreveram alterações de fluxo estimulado e não estimulado com a diminuição dos mesmos em pacientes com

alterações renais quando comparado com pacientes controles com função renal normal (Epstein et al., 1980; Kho et al., 1999; Kao et al., 2000; Martins et al., 2006). Alterações na composição salivar também foram encontradas nestes pacientes com o aumento do pH e da capacidade tampão da saliva (Peterson et al., 1985) (Kho et al., 1999); aumento na secreção de proteínas (Martins et al., 2006; Vesterinen et al., 2007); redução da atividade de enzima peroxidase (Martins et al., 2006; Savica et al., 2008), aumento da concentração de amilase (Tomas et al., 2008) e alterações na secreção de eletrólitos com o aumento da secreção de fosfato, potássio, zinco, magnésio e ureia (Epstein et al., 1980; Tomas et al., 2008) (Martins et al., 2006; Cardoso et al., 2009; Cardoso et al., 2009).

No atendimento clínico desses pacientes, existe a grande necessidade do tratamento de infecções dentárias, pois em indivíduos imunocomprometidos, podem vir a contribuir para a morbidade e rejeição do transplante renal, portanto existe a necessidade de uma avaliação detalhada para o diagnóstico precoce das alterações orais decorrentes da doença e a prevenção de doenças. No entanto estudos mostram que uma grande parte dos pacientes sob-hemodiálise não possuem suas necessidades de tratamento restaurador odontológico atendido (Greenberg; Cohen, 1977; Klassen; Krasko, 2002).

Pacientes que fazem hemodiálise possuem tendência ao sangramento, já que recebem anticoagulantes e em alguns casos possuem disfunção plaquetária, sendo assim, é priorizado que o atendimento odontológico seja feito no dia posterior ao da diálise o que é prático já que neste dia os mesmos não se encontram hospitalizados. No atendimento de pacientes submetidos à hemodiálise e transplantados deve ser considerada a utilização de profilaxia antimicrobiana antes do tratamento dentário que induz sangramento no intuito de proteger a função e a permeabilidade do acesso vascular e do transplante. Outro aspecto importante diz respeito à terapia medicamentosa que necessita ser ajustada dependendo do grau de insuficiência renal crônica, a programação da diálise ou a presença do transplante (Proctor et al., 2005).

Para entender as alterações salivares, pesquisas com animais são importantes para que possamos criar padrões e verificar as causas das alterações encontradas através das análises em glândulas; contudo, quando buscamos na literatura, não encontramos trabalhos que utilizaram um modelo

animal para o estudo das alterações da composição e fluxo salivares na doença renal crônica.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo principal analisar as possíveis alterações salivares em ratos após a remoção de 5/6 da massa renal em dois períodos experimentais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram analisar na saliva dos ratos 8 e 12 semanas após a cirurgia com estímulo simpático e parassimpático:

- fluxo salivar
- concentração de proteínas totais
- atividades das enzimas amilase e peroxidase
- concentração de mucinas salivares, através da determinação das concentrações de ácido siálico
- concentração de íons: Ca^{2+} , Na^+ , K^+ e P
- concentração de ureia salivar
- correlacionar os resultados das análises salivares com alterações séricas

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo com protocolo registrado sob número 146 nas folhas 111 do livro 2. Foram utilizados ratos da raça Wistar, pesando cerca de 250g. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento, ciclo constante de 12hs claro/12hs escuro e temperatura ambiente controlada.

Os animais foram divididos em 3 grupos:

- IRC** - grupo no qual foi induzida a Nefropatia Crônica;
- Sham** - grupo controle positivo no qual foi avaliado o efeito do procedimento cirúrgico;
- Controle** - grupo controle negativo;

Foram avaliados dois tempos experimentais: 8 semanas onde os animais são considerados em uma fase moderada da doença renal crônica (Ribeiro et al., 2009) e 12 semanas onde buscamos uma fase mais avançada da mesma no intuito de avaliar o efeito da progressão da doença renal crônica nos parâmetros estudados.

4.2 INDUÇÃO DA NEFROPATIA

A indução da nefropatia foi feita utilizando o método de ablação de 5/6 da massa renal que em ratos possui metodologia já bem estabelecida e relatada na literatura (Bergamaschi et al., 1997). Resumidamente os ratos dos grupos IRC com aproximadamente 250g de peso corporal foram anestesiados com Dopalen (Vetbrands) na dose de 80mg/Kg p.c. e Anasedan (Vetbrands) na

dose de 20 mg/Kg p.c.. Foi realizada a remoção de pelos da região ventral e, após a verificação da ausência de sensibilidade dolorosa e reflexos, foi realizada abertura da cavidade abdominal, ablação de 5/6 da massa renal por ligadura de dois ramos da artéria renal esquerda e nefrectomia total direita com ligadura do hilo renal e posteriormente sutura em dois planos (muscular e pele).

Figura 4.1 - Modelo experimental de indução da Nefropatia Crônica. (Imagem modificada) (Shimizu, 2005)

Nos grupos Sham, os animais foram anestesiados com Dopalen e Anasedan, foi realizada a remoção dos pelos da região ventral, abertura da região abdominal, pequena manipulação das vísceras com a observação dos rins, porém sem que ocorresse destruição de estruturas e posteriormente da mesma forma, sutura em dois planos (muscular e pele).

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de saliva e sangue foram coletadas de todos os grupos 8 e 12 semanas pós procedimento cirúrgico de indução da nefropatia, simulação do procedimento cirúrgico no grupo Sham e separação dos ratos controles, para avaliar o efeito da progressão da doença no processo de secreção salivar e as possíveis alterações na composição salivar decorrentes desta alteração na função renal. Os animais foram anestesiados utilizando Dopalen e Anasedan e, posteriormente foi injetado intraperitonealmente soluções de pilocarpina (1,0 mg/Kg p.c.) ou isoproterenol (5,0 mg/Kg p.c.) dissolvidos em água destilada para o estímulo da salivação.

Figura 4.2 - Esquema de distribuição dos grupos experimentais

4.3.1 Coleta das amostras de saliva

As amostras de saliva foram coletadas por um período aproximado de 40 minutos, utilizando um funil que direcionava o fluxo salivar ao tubo de coleta que era mantido em gelo, as mesmas foram centrifugadas a $1.540 \times g$ por 5 minutos e armazenadas a -80°C até o momento das análises.

4.3.2 Coleta das amostras de sangue

Amostras de sangue foram coletadas em todos os grupos por punção cardíaca após finalizações das coletas salivares e armazenadas em baixa temperatura em tubos contendo EDTA a 15%. As amostras de sangue foram centrifugadas a $1.540 \times g$ por 10 min. para separação do soro das células sanguíneas e o soro foi mantido em geladeira até o momento das análises.

4.4 ANÁLISES

4.4.1 Análises em amostras de saliva

4.4.1.1 *Fluxo salivar*

O fluxo salivar foi determinado pela relação entre o volume de saliva coletado e tempo de coleta em torno de 40 minutos. O fluxo salivar foi expresso em microlitros por minuto ($\mu\text{l}/\text{min}$) nos grupos com estímulo de isoproterenol e em mililitros por minuto (ml/min) nos grupos com estímulo de pilocarpina.

4.4.1.2 *Determinação da concentração de proteínas totais*

A concentração de proteínas na saliva foi determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albumina bovina como padrão. As leituras de absorbância foram feitas a 660 nm em espectrofotômetro Beckman DU-800. Os resultados foram expressos em mg/ml.

4.4.1.3 *Determinação da atividade enzimática da amilase*

A atividade enzimática da amilase foi determinada pelo método descrito por Fischer e Stein (1961) (Fisher, 1961). As amostras de saliva eram incubadas com solução de amido 1% em tampão Fosfato pH 7,0 (fosfato de potássio 20 Mm e cloreto de sódio 0,7mM) por cinco minutos a 37°C. A reação era interrompida com 0,4 ml de uma solução de ácido dinitrossalicílico, em seguida os tubos eram mantidos em água fervente durante cinco minutos e, após o seu esfriamento as absorbâncias eram medidas a 530 nm, utilizando como padrão uma curva com solução de maltose 1mg/ml. Os resultados foram expressos em mg de maltose/mg de proteína.

4.4.1.4 *Determinação da atividade enzimática da peroxidase*

A atividade enzimática da peroxidase foi determinada pelo método de (Chandra et al., 1977) e (Anderson, 1986). Este método consiste da variação da absorbância 460 nm, pelo espectrofotômetro, de uma mistura de amostras de saliva, tampão fosfato 10Mm, o-dianisidina 10mM e H₂O₂ 2,1mM . Foi usado como padrão uma curva de referência com uma solução de lactoperoxidase 1mg/ml com diluição 1:100. Os resultados foram expressos em µg de lactoperoxidase/mg de proteína.

4.4.1.5 *Determinação da concentração de ácido siálico*

Os conteúdos de ácido siálico livre, total e combinado foram determinados pelos métodos de Aminoff e de Skoza e Mohos (Aminoff, 1961; Skoza; Mohos, 1976), utilizando como padrão o N-Acetil-neuramínico (NANA).

Na determinação da concentração do ácido siálico total, hidrolisamos 140µl de saliva com 140µl de ácido sulfúrico 0,05N durante uma hora a 80°C, em seguida retiramos 140µl e acrescentamos 70µl de ácido periódico 25mM, incubando as amostras por 30 minutos a 37°C. A reação seguirá adicionando 70µl de solução de arsenito de sódio a 2%, 140µl de ácido tiobarbitúrico 0,1M pH 9,0, sendo que nesta etapa as amostras eram mantidas em água fervente por 7,5 minutos e posteriormente acrescentados 560µl de dimetilsulfóxido. A leitura da absorbância era feita a 549 nm.

Para a determinação do ácido siálico livre eram repetidos todos os passos da determinação da concentração de ácido siálico total, excluindo a hidrólise das amostras em ácido sulfúrico 0,05N.

Por fim, a concentração de ácido siálico combinado foi determinada pela subtração dos valores encontrados de total e livre. Os resultados foram expressos em µM/mL

4.4.1.6 *Composição iônica*

A concentração dos íons sódio, potássio, fosfato e cálcio foi medida através de espectrofotômetro de emissão atômica com fonte de excitação de plasma de argônio. Os padrões contendo os vários elementos estudados foram preparados a partir de solução de sal espectrograficamente puro em ácido nítrico. As amostras foram preparadas utilizando 0,5 ml de saliva e 0,5 ml de ácido nítrico a 10% e posteriormente o volume foi diluído 1:10 e os resultados foram expressos em mmol/L.

4.4.1.7 Concentração de ureia salivar

Para a determinação da concentração de ureia salivar foi utilizado o kit ureia CE da labtest, modificando o volume de amostra utilizado primariamente com soro.

A Ureia CE (labtest) é um sistema enzimático-colorimétrico para a determinação da concentração de ureia por reação de ponto final. A ureia contida nas amostras foi hidrolisada pela urease a íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm e um padrão contendo 70mg/dl foi utilizado para o cálculo das concentrações das amostras. Os resultados foram expressos em mg de ureia/ dL.

4.4.2 Análises em amostras de soro

4.4.2.1 Conteúdo sérico de creatinina pelo método Creatinina K

O Kit Creatinina K (labtest) foi utilizado para determinação da concentração de creatinina por método colorimétrico por cinética de dois pontos. A creatinina contida nas amostras de soro reage com o pricato alcalino formando um complexo de cor vermelha, sendo assim, a variação da absorbância lida pelo espectrofotômetro (520nm) é proporcional à concentração de creatinina na amostra. Um padrão contendo 4mg/dl foi utilizado para o cálculo das concentrações desconhecidas. Os resultados foram expressos em mg de creatinina/ dl.

4.4.2.2 *Conteúdo sérico de ureia pelo método ureia CE*

Para determinar a concentração sérica de ureia foi utilizado o kit ureia CE da labtest e os resultados foram expressos em mg de ureia/dL.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste estatístico de análise de variância (ANOVA) e teste de contraste de Tukey, admitindo significância de 5%. Foram realizadas também correlações de Pearson entre os resultados obtidos.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão expressos nas tabelas 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7 e nas figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9.

Na tabela 5.1 estão expressos os resultados de pesos corpóreo inicial e final dos grupos Controle, Sham e IRC do grupo com estímulo de pilocarpina. Observando os valores das médias, não existe diferença entre os pesos iniciais dentre os grupos; foi observado ganho de peso em todos os grupos, sendo que o ganho de peso foi maior no tempo experimental de 12 semanas comparando com o tempo experimental de 8 semanas. Não notamos alterações estatisticamente significantes das médias de pesos finais entre os grupos experimentais nos tempos de 8 e 12 semanas.

Na tabela 5.2 estão expressos os resultados das análises séricas de ureia e creatinina dos grupos Controle, Sham e IRC nos períodos experimentais de 8 e 12 semanas com estímulo de pilocarpina. Foi observado aumento significativo da concentração de ureia nos grupos IRC, sendo de aproximadamente 150% com 8 semanas e 100% com 12 semanas comparando com os grupos Controle e Sham. Observando os resultados da concentração de creatinina, com 8 semanas observamos queda da concentração no grupo Sham comparado com o grupo controle (37,5%) e um aumento da concentração no grupo IRC comparado com o grupo controle (34%). Com 12 semanas foi observado aumento significativo da concentração de creatinina em relação ao grupo Sham (46%).

A tabela 5.3 expõe os resultados de parte dos parâmetros salivares analisados entre os grupos Controle, Sham e IRC nos períodos experimentais de 8 e 12 semanas com estímulo de pilocarpina. Em relação ao fluxo salivar, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos experimentais com 8 e 12 semanas. Em relação ao conteúdo de proteínas totais, não foram observadas alterações significativas entre os grupos com 8 semanas de experimento, porém com 12 semanas foi observado aumento significativo da concentração de proteínas no grupo IRC comparado com o grupo controle (105%) e aumento não significativo em relação ao grupo Sham (80%).

Em relação à atividade da enzima amilase, com 8 semanas foi observada uma queda significativa do grupo IRC em relação ao grupo Sham (45%) e diminuição não significativa em relação ao grupo controle (28%), porém com 12 semanas não foram observadas alterações significativas na atividade enzimática da amilase entre os grupos, mostrando nos três grupos médias menores quando comparadas com os resultados de 8 semanas.

Com 8 semanas não foram encontradas alterações significativas em relação à atividade da enzima peroxidase, porém com 12 semanas de experimento foi observado aumento significativo da atividade enzimática no grupo IRC em relação ao grupo controle (800%) e também em relação ao grupo Sham (678%).

Em relação ao conteúdo de ácido siálico total, livre e ligado não ocorreram alterações significativas entre os grupos e também entre os tempos experimentais.

A tabela 5.4 apresenta os resultados dos componentes eletrolíticos e concentração de ureia salivar analisados entre os grupos controle, sham e IRC nos períodos experimentais de 8 e 12 semanas com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.). Em relação à concentração de ureia salivar, no tempo experimental de 8 semanas, observamos um aumento não estatisticamente significativo de sua concentração no grupo IRC comparando com os grupos controle (58%) e sham (64%). Com 12 semanas de experimento foi observado aumento significativo da concentração de ureia salivar no grupo IRC comparando com os grupos controle (128%) e sham (101%). Em relação às concentrações dos eletrólitos Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , e P, não foram observadas alterações significativas entre os grupos controle, sham e IRC em ambos os tempos experimentais, porém comparando os valores das médias, notamos o aumento das concentrações dos íons K^+ e P de aproximadamente 100% no tempo experimental de 12 semanas comparando com o tempo de 8 semanas.

As figuras 5.1, 5.2 e 5.3 apresentam correlações de Pearson e significância entre parâmetros séricos e salivares analisados, observamos correlação positiva (0,63) e significativa ($p=0,000$) entre os parâmetros séricos de ureia e creatinina, correlação positiva (0,573) e significativa ($p=0,000$) entre os dados de ureia sérica e ureia salivar e correlação positiva (0,48) e significativa ($p=0,002$) entre os dados séricos de creatinina e de ureia salivar.

Falando sobre os resultados dos grupos com estímulo de Isoproterenol, a tabela 5.5 apresenta os resultados de pesos corpóreo inicial e final dos grupos Controle, Sham e IRC em ambos os tempos experimentais; não observamos diferenças estatísticas entre os pesos iniciais entre os grupos, observamos que ocorreu aumento de peso ao final dos tempos experimentais, porém não ocorreram alterações estatisticamente significantes dos pesos corpóreos finais entre os grupos controle, sham e IRC em ambos os tempos experimentais.

A tabela 5.6 apresenta os resultados das análises séricas de ureia e creatinina dos grupos controle, sham e IRC nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Com 8 semanas foi observado aumento significativo da concentração sérica de ureia no grupo IRC comparando com os grupos controle (110%) e sham (123%); com 8 semanas foi observado também aumento significativo da concentração de creatinina no grupo IRC comparando com os grupos controle (46%) e sham (45%). Os resultados de 12 semanas mostram aumento significativo da concentração sérica de ureia no grupo IRC comparado com os grupos controle (85%) e sham (77%). Em relação às concentrações de creatinina, observamos aumento significativo no grupo IRC comparado com o grupo sham (66%).

A tabela 5.7 apresenta as características salivares com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg p.c.) dos grupos controle, sham e IRC nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Em relação ao fluxo salivar, não foram observadas alterações entre os grupos experimentais com 8 semanas de experimento, porém com 12 semanas, observamos uma diminuição significativa de fluxo salivar no grupo IRC comparado ao grupo sham (49%) e diminuição não significativa em relação ao grupo controle (32%).

Em relação ao conteúdo de proteínas totais, não foram observadas alterações significativas entre os grupos experimentais controle, sham e IRC com 8 semanas. Com 12 semanas, observamos diminuição significativa das concentrações de proteína dos grupos sham e IRC (18%) em relação ao grupo controle. Em relação à atividade da enzima amilase, com 8 semanas observamos diminuição significativa de sua atividade no grupo IRC em relação aos grupos controle (40%) e sham (25%); Com 12 semanas, observamos um aumento significativo da atividade da enzima amilase no grupo IRC em relação aos grupos controle (86%) e sham (140%). Em relação à atividade da enzima

peroxidase, observamos com 8 semanas uma diminuição significativa de sua atividade no grupo IRC em relação aos grupos controle (52%) e sham (54%). Com 12 semanas observamos diminuição significativa da atividade da peroxidase no grupo IRC comparado com os grupos controle (41%) e sham (37%).

Em relação às concentrações salivares de ureia, com 8 semanas de experimento observamos um aumento significativo do grupo IRC em relação aos grupos controle (200%) e sham (245%). Com 12 semanas, observamos aumento significativo da concentração salivar de ureia no grupo IRC em relação aos grupos controle (244%) e sham (202%).

As figuras 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 apresentam correlações de Pearson e significância entre os parâmetros de análise. Observamos correlação positiva (0,733) e significativa ($p=0,000$) entre os dados séricos de ureia e creatinina, correlação positiva (0,871) e significativa ($p=0,000$) entre as concentrações salivares e séricas de ureia, correlação positiva (0,645) e significativa ($p=0,000$) entre os dados séricos de creatinina e salivares de ureia, correlação negativa (-0,549) e significativa ($p=0,000$) entre a concentração sérica de ureia e a atividade da enzima peroxidase, correlação negativa (-0,461) e significativa ($p=0,001$) entre a concentração sérica de creatinina e a atividade da enzima peroxidase, correlação negativa (-0,386) e significativa ($p=0,004$) entre fluxo salivar e ureia salivar.

Tabela 5.1 - Pesos corpóreo inicial e final dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/kg p.c.) nos tempos experimentais 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	IRC	Controle	Sham	IRC
Peso inicial (g)	261,1 $\pm$ 14,5 (n=9) AB	244,4 $\pm$ 11,2 (n=8) B	264,4 $\pm$ 16,5 (n=9) A	261 $\pm$ 12,65 (n=10) a	246,7 $\pm$ 9,3 (n=9) a	249,4 $\pm$ 7,76 (n=8) a
Peso final (g)	377,2 $\pm$ 18,2 (n=9) A	379,4 $\pm$ 15,9 (n=8) A	346,1 $\pm$ 43,1 (n=9) A	423,5 $\pm$ 69,7 (n=10) a	397,8 $\pm$ 26,1 (n=9) a	407,5 $\pm$ 16,26 (n=8) a

Tabela 5.2 - Valores séricos de ureia e creatinina dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	IRC	Controle	Sham	IRC
Ureia (mg/dL)	61,66 $\pm$ 6,71 (n=9) A	62,78 $\pm$ 5,23 (n=8) A	158,7 $\pm$ 35,6 (n=7) B	61,30 $\pm$ 6,62 (n=10) a	62,20 $\pm$ 7,67 (n=9) a	124,8 $\pm$ 26,16 (n=8) b
Creatinina (mg/dL)	1,12 $\pm$ 0,31 (n=7) A	0,70 $\pm$ 0,11 (n=8) B	1,61 $\pm$ 0,32 (n=7) C	0,68 $\pm$ 0,22 (n=10) ab	0,54 $\pm$ 0,21 (n=8) a	1,0 $\pm$ 0,33 (n=7) b

Tabela 5.3 - Características salivares de fluxo e componentes proteicos dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	IRC	Controle	Sham	IRC
Fluxo (mL/min)	0,04 $\pm$ 0,01 (n=9) A	0,05 $\pm$ 0,01 (n=8) A	0,05 $\pm$ 0,01 (n=9) A	0,039 $\pm$ 0,01 (n=10) a	0,03 $\pm$ 0,01 (n=9) a	0,03 $\pm$ 0,01 (n=8) a
Proteína (mg/mL)	0,98 $\pm$ 0,19 (n=8) A	0,90 $\pm$ 0,24 (n=8) A	1,04 $\pm$ 0,27 (n=8) A	1,25 $\pm$ 0,32 (n=10) a	1,42 $\pm$ 0,53 (n=9) ab	2,56 $\pm$ 2,13 (n=8) b
Amilase (mg maltose/mg proteína)	331 $\pm$ 80 (n=9) AB	436 $\pm$ 100 (n=7) B	240 $\pm$ 142 (n=7) A	273 $\pm$ 84 (n=10) a	234 $\pm$ 68 (n=9) a	211 $\pm$ 133 (n=8) a
Peroxidase (μ g/mg proteína)	1,47 $\pm$ 0,54 (n=8) A	1,41 $\pm$ 0,66 (n=8) A	1,50 $\pm$ 0,80 (n=7) A	5,14 $\pm$ 3,14 (n=10) a	5,96 $\pm$ 3,23 (n=9) a	46,4 $\pm$ 34,9 (n=8) b
Ácido Siálico Livre (μ M/mL)	0,49 $\pm$ 0,21 (n=9) A	0,69 $\pm$ 0,37 (n=8) A	0,52 $\pm$ 0,27 (n=8) A	0,45 $\pm$ 0,14 (n=10) a	0,46 $\pm$ 0,11 (n=9) a	0,51 $\pm$ 0,20 (n=8) a
Ácido Siálico Ligado (μ M/mL)	3,13 $\pm$ 1,3 (n=8) A	2,91 $\pm$ 0,45 (n=8) A	3,83 $\pm$ 0,78 (n=8) A	5,44 $\pm$ 1,69 (n=10) a	4,72 $\pm$ 1,16 (n=9) a	4,63 $\pm$ 1,25 (n=8) a
Ácido Siálico Total (μ M/mL)	3,66 $\pm$ 1,33 (n=8) A	3,60 $\pm$ 0,78 (n=8) A	4,35 $\pm$ 0,78 (n=8) A	5,90 $\pm$ 1,67 (n=10) a	5,18 $\pm$ 1,12 (n=9) a	5,15 $\pm$ 1,34 (n=8) a

Tabela 5.4 - Características eletrolíticas da saliva dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	Renal	Controle	Sham	Renal
Ureia salivar (mg/dL)	50,5 $\pm$ 35 (n=8) A	48,18 $\pm$ 15,0 (n=8) A	79,25 $\pm$ 22,0 (n=8) A	25,81 $\pm$ 2,75 (n=7) a	29,31 $\pm$ 4,98 (n=7) a	59,04 $\pm$ 12,84 (n=8) b
Ca ²⁺ (mmol/L)	2,35 $\pm$ 1,16 (n=7) A	1,99 $\pm$ 0,68 (n=8) A	1,89 $\pm$ 0,29 (n=8) A	1,68 $\pm$ 0,32 (n=10) a	1,77 $\pm$ 0,48 (n=9) a	1,82 $\pm$ 0,88 (n=7) a
K ⁺ (mmol/L)	47,48 $\pm$ 5,54 (n=7) A	45,05 $\pm$ 4,85 (n=8) A	45,03 $\pm$ 5,92 (n=8) A	91,66 $\pm$ 18,52 (n=10) a	99,15 $\pm$ 9,73 (n=9) a	106,77 $\pm$ 13,69 (n=7) a
Na ⁺ (mmol/L)	32,42 $\pm$ 14,29 (n=7) A	27,44 $\pm$ 8,59 (n=8) A	31,11 $\pm$ 11,98 (n=9) A	37,64 $\pm$ 13,67 (n=10) a	33,90 $\pm$ 18,81 (n=9) a	37,29 $\pm$ 14,46 (n=7) a
P (mmol/L)	0,66 $\pm$ 0,32 (n=7) A	0,47 $\pm$ 0,12 (n=8) A	0,46 $\pm$ 0,19 (n=9) A	0,86 $\pm$ 0,20 (n=10) a	0,80 $\pm$ 0,23 (n=9) a	0,69 $\pm$ 0,13 (n=7) a

Figura 5.1 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a concentração sérica de creatinina (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,63$ e $p = 0,000$)

Figura 5.2 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r= 0,573$ e $p=0,000$)

Figura 5.3 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de pilocarpina (1mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r= 0,48$ e $p=0,002$)

Tabela 5.5 - Pesos corpóreo inicial e final dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de Isoproterenol (5mg/kg p.c.) nos tempos experimentais 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	IRC	Controle	Sham	IRC
Peso inicial (g)	241,5 $\pm$ 6,7 (n=10) A	237,5 $\pm$ 6,5 (n=8) A	248,1 $\pm$ 13,6 (n=8) A	243,33 $\pm$ 5,59 (n=7) a	248,5 $\pm$ 7,47 (n=10) a	244,4 $\pm$ 11,58 (n=7) a
Peso final (g)	357,5 $\pm$ 16,37 (n=10) A	344,4 $\pm$ 24,4 (n=8) A	355 $\pm$ 35,6 (n=8) A	371,6 $\pm$ 25,9 (n=7) a	391,5 $\pm$ 17,8 (n=10) a	374,4 $\pm$ 26,2 (n=7) a

Tabela 5.6 - Valores séricos de ureia e creatinina dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	IRC	Controle	Sham	IRC
Ureia (mg/dL)	68,73 $\pm$ 8,09 (n=10) A	64,49 $\pm$ 3,59 (n=8) A	143,7 $\pm$ 28,3 (n=8) B	71,27 $\pm$ 6,08 (n=9) a	74,63 $\pm$ 6,49 (n=10) a	131,9 $\pm$ 45,8 (n=9) b
Creatinina (mg/dL)	0,79 $\pm$ 0,25 (n=10) A	0,80 $\pm$ 0,11 (n=8) A	1,16 $\pm$ 0,23 (n=7) B	0,81 $\pm$ 0,23 (n=7) ab	0,74 $\pm$ 0,08 (n=8) a	1,23 $\pm$ 0,21 (n=8) b

Tabela 5.7 - Características salivares dos grupos Controle, Sham e IRC com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg p.c.) nos tempos experimentais de 8 e 12 semanas. Os valores estão expressos pela Média $\pm$ DP. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significante $p < 0,05$

	8 semanas			12 semanas		
	Controle	Sham	IRC	Controle	Sham	IRC
Fluxo (μ L/min)	7,52 $\pm$ 2,93 (n=10) A	7,65 $\pm$ 2,05 (n=8) A	6,04 $\pm$ 2,32 (n=8) A	10 $\pm$ 3,9 (n=9) b	13 $\pm$ 4,22 (n=10) a	6,68 $\pm$ 3,58 (n=9) b
Proteína (mg/mL)	32,8 $\pm$ 2,5 (n=10) A	34,62 $\pm$ 2,13 (n=8) A	39,71 $\pm$ 7,29 (n=8) A	51,63 $\pm$ 4,8 (n=7) a	41,04 $\pm$ 6,94 (n=10) b	42,24 $\pm$ 4,55 (n=7) b
Amilase (mg maltose/mg proteína)	5,37 $\pm$ 2,25 (n=10) A	4,12 $\pm$ 1,25 (n=8) A	3,03 $\pm$ 0,76 (n=8) B	3,84 $\pm$ 0,76 (n=7) b	2,97 $\pm$ 0,56 (n=10) b	7,15 $\pm$ 5,8 (n=7) a
Peroxidase (μ g/mg proteína)	26,29 $\pm$ 6,16 (n=10) A	27,32 $\pm$ 6,15 (n=8) A	12,62 $\pm$ 3,02 (n=8) B	19,26 $\pm$ 3,0 (n=7) a	18,47 $\pm$ 6,7 (n=10) a	11,36 $\pm$ 1,5 (n=7) b
Ureia salivar (mg/dL)	49,74 $\pm$ 9,84 (n=10) B	42,84 $\pm$ 5,02 (n=8) B	147,96 $\pm$ 23,92 (n=8) A	50,7 $\pm$ 7,45 (n=7) b	57,62 $\pm$ 9,1 (n=10) b	174,5 $\pm$ 93 (n=7) a

Figura 5.4 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a concentração sérica de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = 0,733$ e $p = 0,000$)

Figura 5.5 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r= 0,871$ e $p=0,000$)

Figura 5.6 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a concentração salivar de ureia (mg/dL) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r= 0,645$ e $p=0,000$)

Figura 5.7 - Correlação entre a concentração sérica de ureia (mg/dL) e a atividade da enzima peroxidase (μg/mg proteína) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = -0,549$ e $p = 0,000$)

Figura 5.8 - Correlação entre a concentração sérica de creatinina (mg/dL) e a atividade da enzima peroxidase (μg/mg proteína) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = -0,461$ e $p = 0,000$)

Figura 5.9 - Correlação entre a concentração salivar de ureia (mg/dL) e o fluxo salivar (μl/ml) dos animais do grupo com estímulo de isoproterenol (5mg/Kg) segundo o teste de Pearson ($r = -0,386$ e $p = 0,004$)

6 DISCUSSÃO

A saliva é o fluido de grande importância na cavidade oral, sua composição está intimamente ligada às suas funções que contribuem com a manutenção da saúde oral. Sabemos que muitos são os fatores que alteram o fluxo e a composição salivar, sendo um deles a presença de alterações sistêmicas crônicas tais como diabetes mellitus e a doença renal crônica, sendo a última o foco do nosso trabalho (Humphrey; Williamson, 2001; Pedersen et al., 2002).

Em nosso estudo analisamos alguns parâmetros salivares orgânicos e inorgânicos em ratos nefrectomizados, comparando com grupos sham e controle em dois tempos experimentais (8 e 12 semanas) e sob dois estímulos diferentes, de pilocarpina (1mg/Kg p.c.) e isoproterenol (5mg/Kg p.c.) no intuito de investigar as possíveis alterações salivares decorrentes da diminuição da função renal.

O modelo animal escolhido neste estudo foi de 5/6 de nefrectomia, que gera uma deficiência na função renal de longa duração devido às adaptações estruturais e funcionais que ocorrem com o tecido renal remanescente, porém com o passar do tempo experimental a função renal se deteriora gerando as complicações sistêmicas características da uremia (Chanutin; Ferris, 1932; Hostetter, 2001). O tempo experimental de 8 semanas foi escolhido por relatos na literatura que indicam que neste período os animais nefrectomizados estão em um estágio moderado da doença (Bergamaschi et al., 1997) e o de 12 semanas no intuito de estudar os mesmos parâmetros com um tempo maior de alteração sistêmica.

Ratos são utilizados como modelo experimental para estudos de processos de secreção salivar, morfologia das glândulas salivares e de suas alterações em condições adversas devido às suas semelhanças com as glândulas salivares de humanos, principalmente na organização estrutural e de produtos finais de secreção, porém quando buscamos na literatura poucos estudos buscaram alterações salivares utilizando o modelo animal de 5/6 de nefrectomia. Alguns estudos buscaram monitorar através da saliva alterações farmacocinéticas de fármacos como a procainamida e ofloxacina na condição

de imparidade renal crônica em ratos (Basseches; DiGregorio, 1982; Ding et al., 1998), porém não encontramos relatos na literatura de estudos que utilizaram o modelo de nefrectomia para analisar parâmetros de composição salivar correlacionando com alterações séricas decorrentes da doença.

No estudo das alterações salivares dos animais nefrectomizados, utilizamos parâmetros de análises que possuem correspondência com os componentes séricos como íons e a concentração de ureia, no intuito de correlacionar as alterações séricas decorrentes da diminuição da função renal com a saliva. Foram avaliados, também, os componentes produzidos pelas glândulas salivares, como quantidade total de proteínas, atividades enzimáticas e o ácido siálico, que quantifica indiretamente o conteúdo de mucinas salivares. As alterações salivares encontradas podem estar relacionadas à disfunção glandular, porém estudos utilizando tecido glandular destes animais são necessários para compreender quais são as alterações glandulares que geram alterações salivares na doença renal crônica.

Falando sobre nossos resultados obtidos, em relação ao peso dos animais, não foram encontradas alterações estatisticamente significantes entre os pesos finais entre os grupos e tempos experimentais de 8 e 12 semanas. A ausência de diminuição significativa do peso final dos animais nefrectomizados foi observada em outros estudos, com 12 semanas de experimento comparando com o grupo sham (Yu et al., 2012) e 5 semanas de experimento comparando com o grupo controle (Barbosa et al., 2007); outro estudo com 21 dias de experimento mostrou diminuição estatisticamente significativa do peso corporal do grupo nefrectomizado em relação aos grupos controle e sham com menor diferença em relação ao grupo sham, mostrando que o estresse gerado pela cirurgia causa um retardo inicial de ganho de peso que é compensado em tempos experimentais mais longos, o que provavelmente ocorreu neste estudo (Uchida et al., 1995).

Observando os resultados das análises séricas realizadas, notamos o aumento significativo das concentrações de ureia e creatinina nos grupos IRC de 8 semanas, este aumento significativo se manteve com 12 semanas de experimento em relação aos grupos controle e sham, mostrando retenção destes compostos no organismo em resposta a diminuição da função renal nestes animais.

Os organismos vivos excretam o excesso de nitrogênio proveniente da quebra metabólica de aminoácidos valendo-se de uma entre três maneiras possíveis; animais aquáticos excretam amônia cuja conversão para produtos menos tóxicos, como a ureia, é excretada pela maioria dos vertebrados terrestres e o ácido úrico que é excretado por aves e répteis terrestres. A ureia é sintetizada no fígado por enzimas do ciclo da ureia, secretada para dentro da corrente sanguínea e retirada pelos rins para excreção pela urina. O ciclo da ureia converte um átomo de carbono do HCO_3^- e dois grupos amino: um da amônia e outro do aspartato ao produto relativamente atóxico que é a ureia, ao custo de quatro ligações fosfato de alta energia (Voet, 2000).

A fosfocreatina é um dos reservatórios de energia para atividade muscular estriada, é produzida nos períodos de repouso por fosforilação da creatina à custa de ATP conforme demonstrado na equação abaixo:

A reação é prontamente reversível e durante a atividade muscular, processa-se no sentido de regeneração do ATP, doador imediato de energia para sua contração. A fosfocreatina, lenta e espontaneamente, é convertida a creatinina, que é liberada na circulação e excretada na urina. Como a quantidade excretada por dia em indivíduos normais é constante (por ser proporcional à massa muscular), a dosagem de creatinina na urina constitui um indicador sensível da função renal (Marzzoco, 1999).

Com a insuficiência renal crônica, as concentrações destes compostos sobem aproximadamente em proporção ao grau de redução dos néfrons funcionais, por esta razão a medida das concentrações dessas substâncias fornece um meio importante para avaliar o grau de insuficiência renal (Guyton, 1997).

Esse aumento da concentração dos principais compostos nitrogenados não proteicos é característico dos estudos que utilizam a metodologia dos 5/6 de nefrectomia sendo observado em diversos tempos experimentais: 14 dias

(Tonshoff et al., 1997), 21 dias (Uchida et al., 1995), 5 semanas (Barbosa et al., 2007), 10 semanas (Svigliero et al., 2010) e 12 semanas (Yu et al., 2012).

Nosso estudo mostrou aumento significativo da concentração salivar de ureia nos grupos IRC com ambos os estímulos com 8 semanas que se manteve com 12 semanas de experimento, além disso, observamos fortes correlações entre as concentrações séricas e salivares de ureia. Estudos clínicos encontraram aumento da concentração salivar de ureia em pacientes com graus variados de doença renal crônica e no seu estágio terminal correlacionando de forma positiva às concentrações séricas da mesma, sendo este um possível método de diagnóstico não invasivo proposto como um indicador de função renal (Obry et al., 1987; Tomas et al., 2008; Peng et al., 2013).

Para as análises salivares, utilizamos dois estímulos da salivação, parassimpático com a pilocarpina na dose de 1mg/Kg p.c. e simpático com o isoproterenol na dose de 5mg/Kg p.c. com o objetivo de investigar alterações nas composições salivares com características diferentes, caracterizando as duas vias principais existentes de secreção salivar. O estímulo simpático atua nas glândulas salivares em receptores β -adrenérgicos, gerando aumento da concentração intracelular de AMPc, que gera a ativação de proteínas do tipo quinase, o que gera uma produção salivar com alto teor proteico e menor volume; já o estímulo parassimpático atua principalmente em receptores muscarínicos colinérgicos ativando a fosfolipase C, que posteriormente gera aumento da concentração intracelular de cálcio, secreção de íons e água e secreção de proteínas pela ativação de proteínas do tipo quinase, gerando uma saliva mais fluida com menor concentração proteica. (Humphrey; Williamson, 2001; Turner; Sugiyama, 2002; Nicolau, 2008).

Quando observamos os resultados das análises salivares com estímulo de pilocarpina, não observamos alteração de fluxo salivar entre os grupos em ambos os tempos experimentais, porém com estímulo de isoproterenol observamos diminuição significativa do mesmo no grupo IRC com 12 semanas de experimento em relação ao grupo Sham. Supomos que a diminuição do fluxo salivar observada seja devido à disfunção do sistema nervoso autônomo. Relatos na literatura falam a respeito de disfunção no sistema nervoso autônomo de pacientes em pré-diálise e em diálise e também sobre a

hiperatividade do sistema nervoso simpático na uremia com a atenuação da responsividade dos receptores α e β adrenérgicos presumivelmente como compensação ao aumento crônico da estimulação simpática, sendo assim, supomos que esteja ocorrendo da mesma forma uma menor responsividade dos receptores glandulares, gerando a diminuição de fluxo observada, porém estudos são necessários para comprovar esta hipótese (Campese et al., 1981; Augustyniak et al., 2002).

Amilase é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas a partir de polissacarídeos como o amido, possui outras funções como auxiliar a formação da película adquirida, adesão de microorganismos na superfície dentária e compreende cerca de 50% das proteínas produzidas pelas glândulas salivares (Al-Hashimi; Levine, 1989; Schenkels et al., 1995; Pedersen et al., 2002). Com 8 semanas de experimento, observamos diminuição significativa da atividade específica da amilase do grupo IRC comparado com os grupos Sham e controle com ambos os estímulos de salivação. Acreditamos que esta diminuição de atividade enzimática seja resultado de alguma alteração no processo de secreção glandular, sendo necessários mais estudos para entender esta alteração.

Com 12 semanas de experimento não observamos alteração da atividade enzimática da amilase entre os grupos experimentais com estímulo de pilocarpina, porém com estímulo de isoproterenol observamos um aumento significativo desta atividade enzimática em relação aos grupos controle (86%) e sham (140%). Estudos indicam que a hiperamilasemia é um achado comum em pacientes com falência renal crônica. Um estudo relatou o aumento das concentrações séricas, pancreáticas e salivares de amilase em pacientes com graus variados de doença renal crônica e também nos submetidos à hemodiálise na ausência de pancreatite em relação ao grupo controle, correlacionando de forma significativa com o clearance de creatinina (Tsianos et al., 1994), esses resultados também correspondem ao estudo de Tomás et al. que observou aumento significativo do conteúdo de amilase do grupo em falência renal crônica em relação ao grupo controle (Tomas et al., 2008).

A peroxidase é uma enzima com propriedades antimicrobianas, catalisa a oxidação de tiocianato (SCN^-) na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo hipotiocianato (OSCN^-), o qual inibe o crescimento bacteriano por

consumo de H_2O_2 , evitando o acúmulo desta substância tóxica atuando como enzima antioxidante (Ashby, 2008). Observando nossos resultados, com 8 semanas de experimento encontramos uma diminuição significativa da atividade enzimática da peroxidase com estímulo de isoproterenol e ausência de alteração significativa com estímulo de pilocarpina.

Com 12 semanas de experimento, notamos que com estímulo de isoproterenol a atividade enzimática permanece diminuída em relação aos outros grupos, porém com estímulo de pilocarpina notamos um aumento significativo da atividade enzimática no grupo IRC comparado com os grupos controle (800%) e também em relação ao grupo Sham (678%) gerando neste tempo experimental uma resultante que corresponde a um aumento significativo da atividade enzimática da peroxidase. Relatos na literatura falam a respeito do estresse oxidativo no estado de uremia, mostrando tanto o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio quanto à diminuição da atividade do sistema antioxidante, com a diminuição dos níveis séricos enzimáticos de pacientes com falência renal crônica, sendo o estresse oxidativo um potencial mediador das alterações cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias dentre outras encontradas na falência renal crônica (Vaziri, 2004; Yu et al., 2012). Pela variação da atividade enzimática observada no grupo IRC em relação aos outros, sugerimos que estejam ocorrendo repercussões glandulares em decorrência de alterações no sistema antioxidante, porém são necessários estudos nesse sentido com as glândulas salivares dos animais nefrectomizados.

O ácido siálico, juntamente com outros compostos carboidratos como a galactose e a fucose, é constituinte das mucinas salivares, atuando na formação da película adquirida e aglutinação bacteriana (Leach, 1963; Zalewska et al., 2000). Neste estudo determinamos o conteúdo de ácido siálico livre, ou seja, aquele que não se apresenta ligado ao núcleo proteico e também o conteúdo de ácido siálico ligado ao núcleo proteico das mucinas salivares. Não foi possível a determinação de ácido siálico nos grupos com estímulo de isoproterenol, em parte pelo pequeno volume de saliva obtido na coleta e também pela grande concentração proteica das amostras que impossibilitou a padronização dentro da metodologia que utilizamos. Nossos resultados não demonstraram alterações significativas das concentrações de ácido siálico

livre, total e consequentemente ligado entre os grupos experimentais em ambos os tempos estudados, mostrando que a diminuição da função renal, até o período estudado (12 semanas) não alterou a secreção de glicoproteínas salivares.

Em relação às concentrações iônicas salivares, nossos resultados não mostraram alterações significativas entre os grupos em ambos os tempos experimentais. Notamos um aumento das concentrações salivares de todos os grupos dos íons K^+ e P de aproximadamente duas vezes no período de 12 semanas, comparando com os grupos de 8 semanas, provavelmente resultante do envelhecimento dos animais. Estudos que encontraram alterações iônicas salivares foram realizados em pacientes com graus moderados a severo e também sob-hemodiálise comparando com um grupo controle, onde foram observados aumentos das concentrações dos íons cálcio, fósforo, sódio, potássio e cloro (Martins et al., 2006; Imirzalioglu et al., 2007; Tomas et al., 2008; Martins et al., 2012). Infelizmente não encontramos as alterações esperadas até o período de 12 semanas, porém estudos das concentrações séricas dos íons citados são necessários para correlacionar com as alterações salivares e também estudos salivares em outros períodos experimentais são necessários para buscar estas alterações.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e nas condições experimentais é lícito concluir que em ratos submetidos aos 5/6 de nefrectomia:

- Ocorreu aumento significativo das concentrações séricas de ureia e creatinina em ambos os tempos experimentais;

- No estímulo parassimpático:

- Com 8 semanas ocorreu diminuição da atividade da enzima amilase e aumento da concentração de ureia salivar;

- Com 12 semanas ocorreu aumento da concentração de proteínas totais, aumento da atividade da enzima peroxidase e aumento da concentração de ureia salivar;

- No estímulo simpático:

- Com 8 semanas ocorreu diminuição da atividade da enzima amilase, diminuição da atividade da enzima peroxidase e aumento da concentração de ureia salivar;

- Com 12 semanas ocorreu diminuição do fluxo salivar em relação ao grupo Sham, aumento da atividade da enzima amilase, diminuição da atividade da enzima peroxidase e aumento da concentração de ureia salivar.

- Observamos alterações salivares mais evidentes no período de 12 semanas comparando com o período de 8 semanas.

REFERÊNCIAS¹

Al-Hashimi I ,Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. Arch Oral Biol. 1989;34(4):289-95.

Al-Nowaiser A, Roberts GJ, Trompeter RS, Wilson M ,Lucas VS. Oral health in children with chronic renal failure. Pediatr Nephrol. 2003;18(1):39-45.

Amerongen AV, Bolscher JG ,Veerman EC. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. Glycobiology. 1995;5(8):733-40.

Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem J. 1961;81(384-92).

Anderson LC. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells in vitro. Arch Oral Biol. 1986;31(7):501-3.

Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. J Dent Res. 2008;87(10):900-14.

Augustyniak RA, Tuncel M, Zhang W, Toto RD ,Victor RG. Sympathetic overactivity as a cause of hypertension in chronic renal failure. J Hypertens. 2002;20(1):3-9.

Barbosa AP, Silva JD, Fonseca EC, Lopez PM, Fernandes MB, Balduino A, Duarte ME. Response of the growth plate of uremic rats to human growth hormone and corticosteroids. Braz J Med Biol Res. 2007;40(8):1101-9.

Basseches PJ ,DiGregorio GJ. Excretion of procainamide into bile and saliva in rats with chronic renal failure. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1982;257(2):180-7.

Baum BJ, Colpo FT ,Filburn CR. Characterization and relationship to exocrine secretion of rat parotid gland cyclic AMP-dependent protein kinase. Arch Oral Biol. 1981;26(4):333-7.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, Picarro IC ,Schor N. Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1997;29(2):169-74.

Buyan N, Cinaz P, Hasanoglu E, Gokcora N ,Bircan Z. Changes in serum levels of IGF-I and IGFBP-3 in children with chronic renal failure. *Endocr J.* 1995;42(3):429-33.

Campese VM, Romoff MS, Levitan D, Lane K ,Massry SG. Mechanisms of autonomic nervous system dysfunction in uremia. *Kidney Int.* 1981;20(2):246-53.

Cardoso EM, Arregger AL, Tumilasci OR, Elbert A ,Contreras LN. Assessment of salivary urea as a less invasive alternative to serum determinations. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(3):330-4.

Caskey FJ, Kramer A, Elliott RF, Stel VS, Covic A, Cusumano A, Geue C, Macleod AM, Zwinderman AH, Stengel B ,Jager KJ. Global variation in renal replacement therapy for end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(8):2604-10.

Chandra T, Das R ,Datta AG. Role of thyroid gland on the peroxidase and iodinating enzymes of submaxillary gland. *Eur J Biochem.* 1977;72(2):259-63.

Chanutin A ,Ferris EB. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy - I Control diet. *Arch of Int Med.* 1932;49(5):767-87.

Chauhan V, Kelepouris E, Chauhan N ,Vaid M. Current concepts and management strategies in chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *South Med J.* 2012;105(9):479-85.

Dawes C. Stimulus effects on protein and electrolyte concentrations in parotid saliva. *J Physiol.* 1984;346:579-588.

Ding G, Naora K, Nagasako S, Hirano H ,Iwamoto K. Excretion of ofloxacin into saliva in rats with renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287(1):31-36.
Dodds MW, Johnson DA ,Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent.* 2005;33(3):223-33.

Edmondson SR, Baker NL, Oh J, Kovacs G, Werther GA ,Mehls O. Growth hormone receptor abundance in tibial growth plates of uremic rats: GH/IGF-I treatment. *Kidney Int* .2000;58(1):62-70.

Epstein SR, Mandel I ,Scopp IW. Salivary composition and calculus formation in patients undergoing hemodialysis. *J Periodontol*. 1980;51(6):336-8.

Ersso C, Thorman R, Rodhe Y, Moller L ,Hylander B. DNA damage in salivary gland tissue in patients with chronic kidney disease, measured by the comet assay. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(2):209-15.

Fisher E, Stein E. Alpha amylase from human saliva. *Biochemistry Preparations*. 1961;8:27-33.

Foundation. NK. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.

Ganibegovic M. Dental radiographic changes in chronic renal disease. *Med Arh*. 2000;54(2):115-8.

Gava AL, Freitas FP, Balarini CM, Vasquez EC ,Meyrelles SS. Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2012;4(3):167-73.

Greenberg MS ,Cohen G. Oral infection in immunosuppressed renal transplant patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977;43(6):879-85.

Guyton A.Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan;1997

Hanna JD, Santos F, Foreman JW, Chan JC ,Han VK. Insulin-like growth factor-I gene expression in the tibial epiphyseal growth plate of growth hormone-treated uremic rats. *Kidney Int*. 1995;47(5):1374-82.

Heintze U, Birkhed D ,Bjorn H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J*. 1983;7(6):227-38.

Hostetter TH. Hypertrophy and hyperfunction of the diabetic kidney. *J Clin Invest.* 2001;107(2):161-2.

Hujairi NM, Afzali B ,Goldsmith DJ. Cardiac calcification in renal patients: what we do and don't know. *Am J Kidney Dis.* 2004;43(2):234-43.

Humphrey SP ,Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001;85(2):162-9.

Ihalin R, Loimaranta V ,Tenovuo J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys.* 2006;445(2):261-8.

Imirzalioglu P, Onay EO, Agca E ,Ogus E. Dental erosion in chronic renal failure. *Clin Oral Investig.* 2007;11(2):175-80.

Ishikawa Y ,Ishida H. Aquaporin water channel in salivary glands. *Jpn J Pharmacol.* 2000;83(2):95-101.

Jaffe EC, Roberts GJ, Cahntler C ,Carter JE. Dental maturity in children with chronic renal failure assessed from dental panoramic tomographs. *J Int Assoc Dent Child.* 1990;20(2):54-8.

Kao CH, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ ,Chang HR. Decreased salivary function in patients with end-stage renal disease requiring hemodialysis. *Am J Kidney Dis.* 2000;36(6):1110-4.

Katchburian E., Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas e correlações clínicas.* Rio de Janeiro. Guanabara Koogan;2004.

Kelly WH, Mirahmadi MK, Simon JH ,Gorman JT. Radiographic changes of the jawbones in end stage renal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1980;50(4):372-81.

Kho HS, Lee SW, Chung SC ,Kim YK. Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(3):316-9.

Klassen JT ,Krasko BM. The dental health status of dialysis patients. J Can Dent Assoc. 2002;68(1):34-8.

Leach SA. Release and Breakdown of Sialic Acid from Human Salivary Mucin and Its Role in the Formation of Dental Plaque. Nature. 1963;199:486-7.

Leber HW, Gleumes L ,Schutterle G. Enzyme induction in the uremic liver. Kidney Int. Suppl 1978;(8):S43-8.

Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J ,Eknoyan G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Ann Intern Med. 2003;139(2):137-47.

Levy HM. Dental considerations for the patient receiving dialysis for renal failure. Spec Care Dentist. 1988;8(1):34-6.

Li J, Lee S, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Lee JH, Chung SC, Kim JS ,Park K. Effects of pilocarpine on the secretory acinar cells in human submandibular glands. Life Sci. 2006;79(26):2441-7.

Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(5):E449-55.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr al ,Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

Malinovschi A, Henrohn D, Eriksson A, Lundberg JO, Alving K ,Wikstrom G. Increased plasma and salivary nitrite and decreased bronchial contribution to exhaled NO in pulmonary arterial hypertension. Eur J Clin Invest. 2011;41(8):889-97.

Martinez JR. Developmental aspects of fluid and electrolyte secretion in salivary glands. Crit Rev Oral Biol Med. 1994;5(3-4):281-90.

Martins C, Siqueira WL, de Oliveira E, Primo LS ,Nicolau J. Salivary analysis of patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. Spec Care Dentist. 2006;26(5):205-8.

Martins C, Siqueira WL, Oliveira E, Nicolau J, Primo LG. Dental calculus formation in children and adolescents undergoing hemodialysis. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(10):1961-6.

Martos F, Monferini E, Giraldo E, De Paoli AM, Hammer R. Characterization of muscarinic receptors in salivary and lacrimal glands of the rat. *Eur J Pharmacol.* 1987;143(2):189-94.

Marzzoco, A, Torres, B. *Bioquímica básica*. Rio de janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, Singh J. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem.* 2004;261(1-2):137-42.

Metzger DL, Kerrigan JR, Krieg RJ, Jr., Chan JC, Rogol AD. Alterations in the neuroendocrine control of growth hormone secretion in the uremic rat. *Kidney Int.* 1993;43(5):1042-8.

Nater UM, Rohleder N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34(4):486-96.

Naugle K, Darby ML, Bauman DB, Lineberger LT, Powers R. The oral health status of individuals on renal dialysis. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):197-205.

Nicolau J. *Fundamentos de bioquímica oral*. Rio de janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Obry F, Belcourt AB, Frank RM, Geisert J, Fischbach M. Biochemical study of whole saliva from children with chronic renal failure. *ASDC J Dent Child.* 1987;54(6):429-32.

Okada H, Davies JE, Yamamoto H. Brown tumor of the maxilla in a patient with secondary hyperparathyroidism: a case study involving immunohistochemistry and electron microscopy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(2):233-8.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* 2002;8(3):117-29.

Peng CH, Xia YC, Wu Y, Zhou ZF, Cheng P ,Xiao P. Influencing factors for saliva urea and its application in chronic kidney disease. Clin Biochem. 2013;46(3):275-7.

Peterson S, Woodhead J ,Crall J. Caries resistance in children with chronic renal failure: plaque pH, salivary pH, and salivary composition. Pediatr Res. 1985;19(8):796-9.

Postorino M, Catalano C, Martorano C, Cutrupi S, Marino C, Cozzupoli P, Scudo P ,Zoccali C. Salivary and lacrimal secretion is reduced in patients with ESRD. Am J Kidney Dis. 2003;42(4):722-8.

Proctor GB ,Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. Auton Neurosci. 2007;133(1):3-18.

Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D ,Porter S. Oral and dental aspects of chronic renal failure. J Dent Res. 2005;84(3):199-208.

Purkerson ML, Hoffsten PE ,Klahr S. Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. Kidney Int. 1976;9(5):407-17.

Ribeiro DA, Campos RR ,Bergamaschi CT. Chronic renal failure induces genetic instability in multiple organs of Wistar rats. Eur J Clin Invest. 2009;39(4):289-95.

Rodrigues Santos MT, Siqueira WL ,Nicolau J. Amylase and peroxidase activities and sialic acid concentration in saliva of adolescents with cerebral palsy. Quintessence Int. 2007;38(6):467-72.

Rohleder N, Wolf JM, Maldonado EF ,Kirschbaum C. The psychosocial stress-induced increase in salivary alpha-amylase is independent of saliva flow rate. Psychophysiology. 2006;43(6):645-52.

Santos F, Carbajo-Perez E, Rodriguez J, Fernandez-Fuente M, Molinos I, Amil B ,Garcia E. Alterations of the growth plate in chronic renal failure. Pediatr Nephrol. 2005;20(3):330-4.

Savica V, Calã LA, Davis PA ,Bellinghieri G. Hyperphosphoremia in kidney failure- salivary phosphate as a marker and possible target. Clin Nephrol. 2008;69(3):229.

Schenkels LC, Veerman EC ,Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. Crit Rev Oral Biol Med. 1995;6(2):161-75.

Sesso R ,Gordan P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. J Bras Nefrol. 2007;29(1):9-12.

Shannon IL. Climatological effects on human parotid gland function. Arch Oral Biol. 1966;11(4):451-3.

Shimizu MHM. A N- acetilcisteína atenua a progressão da doença renal crônica. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2005.

Shobeiri N, Adams MA ,Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: A review. Am J Nephrol. 2010;31(6):471-81.

Siqueira WL ,Nicolau J. Stimulated whole saliva components in children with Down syndrome. Spec Care Dentist. 2002;22(6):226-30.

Skoza L ,Mohos S. Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulphoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-acetylation. Biochem J. 1976;159(3):457-62.

Soriano Cabrera S ,Sociedade Española de Nefrologia. [Definition, classification of stages, and prevalence of chronic kidney disease. Guidelines for early detection. Risk factors for chronic kidney disease]. Nefrologia. 2004;24 Suppl(6):27-34, 187-235.

Sreebny LM. Saliva in health and disease: an appraisal and update. Int Dent J. 2000;50(3):140-61.

Sreebny LM ,Schwartz SS. A reference guide to drugs and dry mouth--2nd edition. Gerodontology. 1997;14(1):33-47.

Sviglerova J, Kuncova J, Nalos L, Holas J, Tonar Z, Rajdl D ,Stengl M. Cardiac remodeling in rats with renal failure shows interventricular differences. Exp Biol Med (Maywood). 2012;237(9):1056-67.

Sviglerova J, Kuncova J, Nalos L, Tonar Z, Rajdl D, Stengl M. Cardiovascular parameters in rat model of chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy. *Physiol Res*. 2010;59 Suppl 1:S81-8.

Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*. 1982;11(1):1-17.

Tarrass F, Benjelloun M, Bensaha T. Severe jaw enlargement associated with uremic hyperparathyroidism. *Hemodial Int*. 2008;12(3):316-8.

Tenovuo J, Grahn E, Lehtonen OP, Hyypä T, Karhuvaara L, Vilja P. Antimicrobial factors in saliva: ontogeny and relation to oral health. *J Dent Res*. 1987;66(2):475-9.

Tomas I, Marinho JS, Limeres J, Santos MJ, Araujo L, Diz P. Changes in salivary composition in patients with renal failure. *Arch Oral Biol*. 2008;53(6):528-32.

Tonshoff B, Powell DR, Zhao D, Durham SK, Coleman ME, Domene HM, Blum WF, Baxter RC, Moore LC, Kaskel FJ. Decreased hepatic insulin-like growth factor (IGF)-I and increased IGF binding protein-1 and -2 gene expression in experimental uremia. *Endocrinology*. 1997;138(3):938-46.

Tortora, G. *Princípios de anatomia e fisiologia*. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan; 2002.

Tschoppe P, Wolgin M, Pischon N, Kielbassa AM. Etiologic factors of hyposalivation and consequences for oral health. *Quintessence Int*. 2010;41(4):321-33.

Tsianos EV, Dardamanis MA, Elisaf M, Vasakos S, Siamopoulos KC. The value of alpha-amylase and isoamylase determination in chronic renal failure patients. *Int J Pancreatol*. 1994;15(2):105-11.

Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis*. 2002;8(1):3-11.

Uchida N, Kurata N, Shimada K, Nishimura Y, Yasuda K, Hashimoto M, Uchida E, Yasuhara H. Changes of hepatic microsomal oxidative drug metabolizing

enzymes in chronic renal failure (CRF) rats by partial nephrectomy. *Jpn J Pharmacol.* 1995;68(4):431-9.

Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 2004;24(5):469-73.

Vesterinen M, Ruukonen H, Leivo T, Honkanen AM, Honkanen E, Kari K, Lindqvist C, Meurman JH. Oral health and dental treatment of patients with renal disease. *Quintessence Int.* 2007;38(3):211-9.

Voet, D., Voet, JG., Pratt, CW . *Fundamentos de bioquímica.* Porto alegre: Artes Médicas Sul LTDA; 2000.

Weiner DE. Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(3 Suppl):S1-9.

Wolff A, Stark H, Sarnat H, Binderman I, Eisenstein B, Drukker A. The dental status of children with chronic renal failure. *Int J Pediatr Nephrol.* 1985;6(2):127-32.

Yu X, Liu H, Zou J, Zhu J, Xu X, Ding X. Oxidative stress in 5/6 nephrectomized rat model: effect of alpha-lipoic acid. *Ren Fail.* 2012;34(7):907-14.

Zalewska A, Zwierz K, Zolkowski K, Gindzienski A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(4):1067-79.

ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **146** nas fls. **111** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Fernando Neves Nogueira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ana Carolina Romero, Flávia Kazue Ibuki e a pesquisadora Alyne Simões**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **20.10.2011**, com validade de **1** anos.

São Paulo, 25 de outubro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP