



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Helena Oliveira Deróbio

**Efeito da dieta hiperlipídica na secreção salivar e ingestão de
água induzidas por pilocarpina em machos e a
participação do estrógeno em fêmeas**

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Helena Oliveira Deróbio

**Efeito da dieta hiperlipídica na secreção salivar e ingestão de
água induzidas por pilocarpina em machos e a
participação do estrógeno em fêmeas**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista, para a
obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

**Orientadora Débora Simões de Almeida
Colombari**

**Araraquara
2023**

D437e Deróbio, Helena Oliveira
Efeito da dieta hiperlipídica na secreção salivar e ingestão de água induzidas por pilocarpina em machos e a participação do estrógeno em fêmeas / Helena Oliveira Deróbio. -- Araraquara, 2023
32 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia)
- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Débora Simões de Almeida Colombari

1. Obesidade. 2. Pilocarpina. 3. Estrogênios. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Helena Oliveira Deróbio

**Efeito da dieta hiperlipídica na secreção salivar e ingestão de
água induzidas por pilocarpina em machos e a
participação do estrógeno em fêmeas**

Orientador: Prof (a) Dr (a) Débora Simões de Almeida Colombari

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 30 de novembro de 2023.

Dedico esse trabalho ao meu pai João Gabriel, à minha mãe Valéria, minha irmã Luiza, à minha orientadora Débora Simões de Almeida Colombari, aos colegas de laboratório e aos professores que contribuíram para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais João Gabriel e Valéria, agradeço por todo apoio, incentivo, por não medirem esforços para que eu possa realizar meus sonhos, por sempre estarem ao meu lado e me darem a oportunidade de sempre priorizar meus estudos. Agradeço também a minha irmã pela companhia, conselhos e conversas.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, agradeço imensamente por ter sido a primeira a me acolher e me guiar na vida acadêmica durante todos esses anos, pelas oportunidades, ensinamentos, paciência e compreensão. Aos meus colegas de laboratório, especialmente Tais Varanda, Gabriela Lucera, Jéssica Mateus de Sá e Marcos Vinicius Fernandes, obrigada por toda ajuda durante os experimentos e por tornarem a rotina no laboratório muito mais leve.

Às minhas amigas Larissa Franco Amaro e Larissa Oziliero Massucatto, obrigada por todos os momentos juntas e por fazerem parte dessa etapa da minha vida.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico agradeço pelo apoio financeiro essencial para realização do presente trabalho.

Deróbio HO. Efeito da dieta hiperlipídica na secreção salivar e ingestão de água induzidas por pilocarpina em machos e a participação do estrógeno em fêmeas [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

A obesidade pode levar a comorbidades como a diabetes, hipertensão e até mesmo secar bucal. Sua prevalência é semelhante entre homens e mulheres. Durante a menopausa há redução de secreção salivar e esse efeito pode ser evidenciado também em ratas ovariectomizadas. Sabemos que existe dimorfismo sexual para uma série de funções fisiológicas, o que pode ser decorrente da ação dos hormônios sexuais ao longo do ciclo reprodutivo. A secreção salivar pode ser induzida experimentalmente pelo agonista colinérgico pilocarpina (PILO), a qual também induz ingestão de água. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi verificar a secreção salivar e ingestão de água induzidas por PILO em ratos e ratas alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD), com ou sem a presença de estrógeno (E2). Para isso, ratos e ratas (Holzmann adultos 300-320 g), foram alimentados por 6 semanas com dieta padrão (SD, 11% de calorias de gordura) ou com HFD (46% de calorias de gordura). As fêmeas foram submetidas a 3 tratamentos: SHAM (sem cirurgia), ovariectomia (OVX) e OVX+E2 (17 β -Estradiol; 10 μ g/0,1 ml/rata). A OVX foi realizada no mesmo dia que a separação aleatória das ratas em SD e HFD. A reposição com E2 foi realizada a partir da 5ª semana e durou até a eutanásia (8-10 dias). Na 6ª semana, sob anestesia (cetamina, 100 mg/kg de peso corporal, p.c., ip) a secreção salivar foi medida por 7 min por bolas de algodão na cavidade oral após salina (sal) ou PILO (1 mg/kg de p.c.). Após 3 dias, a ingestão de água foi medida por 1 h, imediatamente após salina ou PILO. Foi observado ganho de peso semelhante entre ratos e ratas SD e HFD. Porém, os animais alimentados com HFD tiveram a adiposidade maior do que os animais SD, independente do sexo. A OVX foi confirmada com a redução do peso do útero e a reposição com E2 com o aumento do peso uterino. A secreção salivar induzida por pilocarpina aumentou em ratos alimentados com HFD, enquanto houve uma redução da secreção salivar em ratas SD-OVX, a qual foi revertida pelo E2. Em ratas HFD não foi observada alteração na secreção salivar induzida por PILO. Ratos alimentados com HFD tiveram a ingestão de água induzida por pilocarpina semelhante aos ratos SD, enquanto nas fêmeas houve uma tendência das ratas OVX, seja SD ou HFD, de ingerirem menos água.

Palavras – chave: Obesidade. Pilocarpina. Estrogênios.

Deróbio HO. Effect of high-fat diet intake on salivary secretion and water intake induced by pilocarpine in males and the participation of estrogen in females rats [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Obesity can lead to comorbidities such as diabetes, hypertension and even dry mouth. Its prevalence is similar between men and women. During menopause there is a reduction in salivary secretion and this effect can also be seen in ovariectomized rats. We know that sexual dimorphism exists for a series of physiological functions, which may be due to the action of sexual hormones throughout the reproductive cycle. Salivary secretion can be experimentally induced by the cholinergic agonist pilocarpine (PILO), which also induces water intake. Therefore, the objective of the work was to verify salivary secretion and water intake induced by PILO in rats fed a high-fat diet (HFD), with or without the presence of estrogen (E2). For this, rats (Holzmann adults 300-320 g) were fed for 6 weeks with a standard diet (SD, 11% calories from fat) or with HFD (46% calories from fat). Females were subjected to 3 treatments: SHAM (without surgery), ovariectomy (OVX) and OVX+E2 (17 β -Estradiol; 10 μ g/0.1 ml/rat). OVX was performed on the same day as the random separation of rats into SD and HFD. Replacement with E2 was performed from the 5th week onwards and lasted until euthanasia (8-10 days). In the 6th week, under anesthesia (ketamine, 100 mg/kg body weight, b.w., ip) salivary secretion was measured for 7 min by cotton balls in the oral cavity after saline (salt) or PILO (1 mg/kg b.w.). After 3 days, water intake was measured for 1 h, immediately after saline or PILO. Similar weight gain was observed between SD and HFD rats. However, animals fed HFD had greater adiposity than SD animals, regardless of sex. OVX was confirmed with reduced uterine weight and E2 replacement with increased uterine weight. Pilocarpine-induced salivary secretion increased in HFD-fed rats, while there was a reduction in salivary secretion in SD-OVX rats, which was reversed by E2. In HFD rats, no change in PILO-induced salivary secretion was observed. Rats fed HFD had pilocarpine-induced water intake similar to SD rats, while in females there was a tendency for OVX rats, whether SD or HFD, to ingest less water..

Keywords: Obesity. Pilocarpine. Estrogens.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Obesidade	12
3.2 Menopausa e estrógeno	13
3.3 Salivação.....	14
3.4 Ingestão de água	15
4 MATERIAL E MÉTODO.....	16
4.1 Animais	16
4.2 Dietas.....	16
4.3 Anestesia e eutanásia.....	17
4.4 Tecido adiposo	17
4.5 Secreção salivar	17
4.6 Medida da ingestão de água.....	17
4.7 Ovariectomia.....	18
4.8 Reposição de estrógeno.....	18
4.9 Análise estatística	18
4.10 Protocolos experimentais.....	18
5 RESULTADOS.....	20
5.1 Peso corporal e tecido adiposo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas	20
5.2 Peso corporal, tecido adiposo e índice uterino em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica por 6 semanas	21
5.3 Salivação induzida por pilocarpina em ratos e ratas alimentados por 6 semanas com dieta hiperlipídica	22
5.4 Ingestão de água induzida por pilocarpina em ratos e ratas alimentados por 6 semanas com dieta hiperlipídica	24
6 DISCUSSÃO	25

7 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS.....	29
ANEXO A.....	32

1 INTRODUÇÃO

Esse Trabalho de Conclusão de Curso foi baseado no Relatório Final da Proposta de nº 1334 e 4489, financiado pela Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (ANEXO A).

A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura que traz prejuízos a saúde do indivíduo. Apontada como uma epidemia mundial, a obesidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública. O índice de obesidade (índice de massa corporal $> 30 \text{ kg/m}^2$) no Brasil é de aproximadamente 20,3% na população adulta (acima de 18 anos) e na população masculina no Brasil é de 55,5%, enquanto nas mulheres é de 49,1%¹, sendo que nas mulheres, durante a menopausa há maior acúmulo de gordura abdominal comparada com mulheres na pré-menopausa². A população jovem (18 a 24 anos) se destaca com melhor índice, 38%, enquanto pessoas de 45 a 64 anos ultrapassam os 61%³. Uma das consequências da obesidade são as comorbidades associadas à ela, tais como hipertensão e diabetes tipo II⁴⁻⁷, bem como redução da secreção salivar e alteração da composição da saliva⁸⁻¹⁰, que pode levar a periodontite¹⁰.

Em roedores, a obesidade pode ser induzida através de uma dieta hiperlipídica (HFD) palatável, a qual se assemelha a dieta adotada pela sociedade ocidental, rica em gorduras e carboidratos^{5,7}. Animais alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas apresentam redução da ingestão diária de água prandial (ingestão de água que acompanha a ingestão de ração) assim que a dieta era oferecida, e que parte disso era decorrente de uma maior salivação durante a alimentação¹¹. Por outro lado, dados da literatura demonstraram que ratos machos alimentados 8 semanas com dieta hiperlipídica contendo $\approx 60\%$ de calorias proveniente de gordura tem uma redução da secreção salivar induzida pela pilocarpina, bem como aparecimento de gotículas de gordura na glândula submandibular, que poderia estar relacionada com a hipofunção da glândula¹².

A saliva é importante para a fonação, deglutição, gustação, mastigação, tamponamento do pH bucal, remineralização dental, prevenção de infecções, termorregulação entre outras funções^{13,14}. Pacientes dessalivados (com xerostomia) exibem sinais e sintomas como boca seca, queimaduras, infecção da mucosa oral, dificuldade de alimentação, desconforto ao falar, aumento no índice de cáries e doenças periodontais¹⁴. A pilocarpina, inicialmente extraída da planta brasileira

Pilocarpus jaborandi, age sobre as glândulas salivares e sudoríparas, produzindo salivação e sudorese¹⁵. Embora a pilocarpina possa estimular a secreção salivar agindo diretamente em receptores das glândulas salivares, sabe-se que a pilocarpina pode cruzar a barreira hematoencefálica¹⁶ e além da salivação, injeções periféricas de pilocarpina também induzem a ingestão de água por atuar em receptores muscarínicos em áreas prosencefálicas envolvidas com a ingestão de água^{17,18}.

Sabemos que existe dimorfismo sexual para uma série de funções fisiológicas, o que pode ser decorrente da ação dos hormônios sexuais ao longo do ciclo reprodutivo. No caso da secreção salivar, observou-se que há uma maior prevalência de xerostomia em mulheres, particularmente em mulheres idosas, ou seja, em mulheres já na menopausa¹⁹. Esse período é caracterizado pela ausência de menstruação por pelo menos 1 ano, o que ocorre naturalmente com o envelhecimento, devido à ausência de folículos ovarianos, que são liberados durante os ciclos menstruais. Na menopausa, os ovários não produzem mais estrógeno e progesterona em quantidades significantes. O estrógeno, um hormônio esteroide fundamental, está associado a diversas funções no organismo feminino, estimulando o crescimento dos folículos ovarianos, agindo no metabolismo ósseo, contribui para saúde cognitiva e principalmente participa da regulação do metabolismo energético²⁰. Buscamos analisar no presente trabalho a ingestão de água e secreção salivar induzidas por pilocarpina em ratas e ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi analisar a secreção salivar e ingestão de água induzidas por pilocarpina em ratos e ratas alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas, sendo que os parâmetros foram analisados em ratas com ovários intactos, ovariectomizadas (menopausa) ou com reposição de estrógeno.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A obesidade pode levar a comorbidades como a diabetes, hipertensão e até mesmo secura bucal^{4,5}, e sua prevalência é semelhante entre homens e mulheres¹. A obesidade é definida como o acúmulo excessivo de gordura que traz prejuízos a saúde do indivíduo¹. No Brasil, os últimos dados do IBGE demonstraram que 52,2% da população brasileira está acima do peso ideal³. Durante a menopausa há um acúmulo maior de gordura abdominal, o qual pode promover alterações metabólicas². A pilocarpina é um agonista colinérgico, capaz de estimular a secreção salivar e ingestão de água¹⁵.

3.1 Obesidade

De acordo com as conclusões de Bluher¹, a obesidade pode ser caracterizada como um acúmulo excessivo de tecido adiposo que compromete a saúde do indivíduo. No caso de adultos, um índice de massa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² é usado para definir a condição como obesidade. A obesidade representa um desafio significativo para a saúde pública, atingindo proporções epidêmicas. Está diretamente relacionada a um maior risco de desenvolver diabetes tipo 2 e hipertensão, como demonstrado por Speretta et al.⁵ e Jensen et al.⁴. A etiologia da obesidade envolve um desequilíbrio energético, com a ingestão de calorias excedendo a quantidade de calorias gastas, e pode ser influenciada por fatores socioculturais, sexo, predisposição genética, envelhecimento, falta de atividade física, entre outros aspectos.

Segundo Despres e Lemieux²¹, a síndrome metabólica é definida como um conjunto de fatores de risco que inclui, entre outros, a obesidade abdominal, resistência à insulina, níveis elevados de triglicerídeos e pressão arterial elevada.

Para Cinti²², o tecido adiposo se encontra distribuído em depósitos claramente definidos, localizados em níveis superficiais e profundos do corpo. Nos roedores adultos, os principais depósitos viscerais englobam as áreas mediastinais, perirrenais, perigonadais, mesentéricas e retroperitoneais. O tecido adiposo pode apresentar duas variantes, sendo elas branca e marrom, e a proporção relativa entre esses dois tipos de tecido pode variar dependendo de fatores como idade, condições metabólicas e genéticas. Vale destacar que o tecido adiposo branco frequentemente contém um

infiltrado de macrófagos, um fator que pode estar relacionado a condições de saúde importantes, como a resistência à insulina.

A obesidade está associada ao aumento das citocinas inflamatórias e ao aumento da atividade do sistema renina-angiotensina. Essa condição induz a neuroinflamação no prosencéfalo, que é a região onde ocorre o processamento da sede, como observado por Kloet et al.²³. Esses fatores podem estar ligados à redução na ingestão de água, como apontado por De Castro et al.²⁴.

3.2 Menopausa e estrógeno

De acordo com as observações de De Jesus e Henry²⁰, a regulação do consumo e do gasto energético apresenta um claro dimorfismo sexual, indicando que as mulheres jovens têm uma maior proteção contra o ganho de peso e doenças cardiovasculares. No entanto, durante a menopausa, as mulheres passam por alterações devido à diminuição dos hormônios sexuais, em especial o estrógeno, o que resulta em mudanças na distribuição do tecido adiposo e um aumento na suscetibilidade ao ganho de peso. O estrógeno é conhecido por desempenhar um papel na regulação do metabolismo energético. O tratamento com estrógeno aumenta a sensibilidade à leptina, o que por sua vez leva a uma redução na ingestão de alimentos.

Perez- Gonzalez et al.¹⁹ observaram que ocorre uma maior prevalência de xerostomia em mulheres idosas, ou seja, aquelas que já passaram pela menopausa. A menopausa é caracterizada pela cessação da menstruação por um período mínimo de um ano, devido à ausência de folículos ovarianos, que são liberados durante os ciclos menstruais.

Segundo as constatações de Toth et al.², as transformações corporais resultantes da menopausa podem explicar o aumento no risco de doenças cardiovasculares e metabólicas nos anos posteriores a esse período. Mulheres no pós-menopausa tendem a apresentar maior quantidade de gordura intra-abdominal em comparação com mulheres na pré-menopausa.

3.3 Salivação

A saliva desempenha diversas funções essenciais, incluindo a fonação, deglutição, gustação, mastigação, regulação do pH bucal, remineralização dos dentes, prevenção de infecções, termorregulação e muito mais, como destacado por Pedersen et al.^{13,14}.

De acordo com Modeer et al.⁹, pacientes obesos frequentemente apresentam uma redução no fluxo salivar estimulado, o que, como sugerido por Schwenger, pode resultar em um maior número de cáries dentárias e outras doenças bucais, como a periodontite.

Por outro lado, de acordo com Sá et al.¹¹, ratos que são alimentados com uma dieta hiperlipídica tendem a ter uma redução no consumo de água diária e durante as refeições. Isso pode indicar que a maior produção de saliva durante a alimentação desempenha um papel importante nesse comportamento. No entanto, de acordo com Kolodziej et al.¹², ratos que foram alimentados com uma dieta hiperlipídica por 8 semanas mostraram uma diminuição na secreção salivar estimulada por pilocarpina, possivelmente devido ao estresse oxidativo nas glândulas salivares e à presença de vacúolos.

Conforme observado por Ferguson¹⁵, a pilocarpina é um sialogogo extraído de uma planta brasileira, frequentemente utilizada como estímulo para a produção de saliva em casos de disfunção das glândulas salivares. A diminuição na secreção salivar pode ocorrer devido à desidratação, que afeta diabéticos, pessoas que fazem uso de diuréticos, medicamentos anticolinérgicos, além de surgir como resultado de tratamentos de radioterapia na região da cabeça e do pescoço, bem como da síndrome de Sjogren. A disfunção das glândulas salivares pode levar a sintomas como boca seca, desconforto na fala, mucosites, cáries dentárias, doença periodontal e dificuldades com próteses.

De acordo com Freedman et al.¹⁶, a pilocarpina possui a capacidade de estimular a secreção salivar, agindo diretamente nos receptores localizados nas glândulas salivares, além de conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e afetar o sistema nervoso central.

Conforme Gay et al.¹⁷ mostram, injeções parenterais de pilocarpina resultaram em um aumento na ingestão de água em ratos. Esse comportamento não é mediado

por meio de uma via colinérgica, mas sim pela ação da pilocarpina nos receptores muscarínicos presentes no sistema nervoso central.

3.4 Ingestão de água

De acordo com McKinley e Johnson²⁵, a sede desempenha um papel crucial na motivação para a ingestão de líquidos, sendo um componente fundamental da sequência coordenada que mantém o volume e a composição dos fluidos corporais. As vias ascendentes em direção ao prosencéfalo desempenham um papel central na geração da sede, e é nessa região que o processamento dessa resposta tem início.

Segundo as descobertas de Paulin²⁶, injeções periféricas de pilocarpina provocam a produção de saliva e aumentam a ingestão de água. A área septal medial e seus receptores muscarínicos fazem parte do circuito localizado no prosencéfalo que é ativado pela pilocarpina periférica.

A administração periférica de pilocarpina, mas atuando em receptores colinérgicos do sistema nervoso central, é capaz de estimular a ingestão de água, como mencionado por Gay et al.¹⁷. A manutenção da dieta hiperlipídica pode desencadear uma euroinflamação central, que afeta a resposta da pilocarpina nas vias neurais relacionadas a ingestão de água. Ratos alimentados com uma dieta rica em gordura por 6 semanas apresentaram sinais de neuroinflamação no bulbo, conforme observado por Speretta et al.⁷ em 2019, e outros estudos indicam a presença de neuroinflamação no prosencéfalo, onde se inicia o processo de regulação da sede, como evidenciado por de Kloet et al.²³ e McKinley e Johnson²⁵.

4 MATERIAL E MÉTODO

A seguir serão citados os métodos referentes aos experimentos de salivação e ingestão de água induzidas por pilocarpina em ratos e ratas alimentadas com dieta hiperlipídica, ovariectomizadas ou com tratamento com estrógeno.

4.1 Animais

Serão utilizados ratas e ratos Holtzman adultos (300 a 320 g), mantidas em gaiolas individuais com livre acesso a ração e água, em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas das 7 h às 19:00 h). Os protocolos propostos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA e foram aprovados pelo CEUA da FOAr (processo # 15/2021 e #13/2020).

4.2 Dietas

As ratas serão alimentadas com ração padrão para rato (Socil; Paulínia, SP), que será denominada dieta padrão (SD) contendo: 23 g de proteína, 49 g de carboidrato, 4 g de gordura, 5 g de fibras e 200 mg de sódio por 100 g de dieta, conforme fornecido pelo fabricante ou dieta hiperlipídica (HFD) palatável contendo 22,3 g de proteína, 24,5 g de gordura, 40,8 g de carboidrato, 5,9 g de fibra e 253 mg de sódio por 100 g de dieta, segundo exame bromatológico realizado com amostra da dieta (Ribersolo, Ribeirão Preto, SP, Brazil). Esta HFD palatável peletizada contém na sua composição amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1 associado com mix de vitaminas/minerais e núcleo concentrado de ração para rato (PragSoluções Biociências; Jaú, SP). O valor calórico das dietas será de aproximadamente 3,24 kcal/g para a DP e 4,79 kcal/g para HFD, onde para a HFD a % Kcal corresponde a 18,86 de proteínas, 46,63 de gordura, 34,51 de carboidrato.

4.3 Anestesia e eutanásia

As ratas serão anestesiadas com injeção intraperitoneal (ip) de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinado com xilasina [7 mg/kg de peso corporal (pc)] para todas as cirurgias e cetamina (100 mg/kg pc) para o experimento de salivação. Durante o procedimento cirúrgico, o nível de anestesia será monitorado por meio da reação reflexa ao pinçamento da pata, e ajustado se necessário. Após as cirurgias os animais receberão uma dose intramuscular profilática de antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs/estreptomicina – 33 mg; Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) e uma injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (Cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; Ketoflex, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil) e 1 ml de solução fisiológica (NaCl 0,15 M). No final dos experimentos as ratas serão sacrificadas sob anestesia profunda com tiopental sódico (100 mg/kg de pc; i.p.; Cristália, Itapira, SP, Brasil).

4.4 Tecido adiposo

Os tecidos adiposos retroperitoneal, gonadal e mesentérico serão imediatamente retirados e seu peso úmido será feito imediatamente após a eutanásia dos animais. A coleta de tecido adiposo será realizada de acordo com as descrições de Cinti²².

4.5 Secreção salivar

Os ratos foram anestesiados com ketamina. Saliva foi coletada com o auxílio de pequenas bolas de algodão previamente pesadas e colocadas nas porções laterais e dorso-pósterio-lingual. A coleta foi realizada durante 7 minutos iniciando-se 10 minutos após a injeção de pilocarpina intraperitonealmente ou salina (veículo) (1mg/kg em relação ao p.c.)¹⁸.

4.6 Medida da ingestão de água

Os animais receberam a injeção de pilocarpina e após 15 minutos iniciou-se a medida da ingestão de água, que foi realizada a cada 15 minutos durante 1 hora.

Foram utilizados tubos com divisão de 0,1 ml adaptados com bicos de metal para as medidas de ingestão de água.

4.7 Ovariectomia

Para realização ovariectomia, as ratas serão anestesiadas, conforme descrito acima, e terão os ovários removidos bilateralmente. Ratas controle serão submetidas ao mesmo processo inicial da cirurgia, porém seus ovários serão mantidos intactos. Para verificação da ovariectomia, após a eutanásia, o útero será removido para calcularmos o índice uterino conforme descrito na literatura²⁷.

4.8 Reposição de estrógeno

A reposição com estrógeno foi feita a partir da quinta semana de dieta seja SD ou HFD, por 7 dias antes dos experimentos e até a eutanásia. As ratas ovariectomizadas receberam estradiol (3-bezoato de β -estradiol dissolvido em óleo de girassol) na dose de 10 μ g de estradiol/rata, administrado subcutaneamente (s.c.), conforme descrito anteriormente ou óleo de girassol (veículo; 0,1 ml/rata, s.c.), como descrito²⁸.

4.9 Análise estatística

Os dados serão expressos como média \pm EPM. A análise de variância de uma ou duas vias, associada ao teste de Student-Newman-Keuls, ou o teste *t* de Student serão utilizados quando apropriado, assumindo-se $p < 0,05$.

4.10 Protocolos experimentais

Todos os animais foram pesados semanalmente. No final dos experimentos, os animais sacrificados com sobredose anestésica (tiopental sódico, 100 mg/kg de p.c; ip) e o tecido adiposo, útero e fígado foram coletados conforme descrito na metodologia. Na semana 0, que é a que antecede a introdução da HFD, todos os animais foram alimentados com SD. Os animais foram em seguida distribuídos aleatoriamente em ratos SD e ratos HFD. Os ratos SD continuaram se alimentando

de SD, enquanto os ratos HFD começaram a se alimentar de HFD. Neste mesmo dia, as ratas foram submetidas a OVX ou a cirurgia fictícia. Na 5ª semana após a OVX/cirurgia fictícia, iniciou-se a administração de estrógeno (E2) ou óleo (veículo) por 7 dias e iniciou-se os experimentos com a manutenção da administração de E2 ou veículo até a eutanásia.

5 RESULTADOS

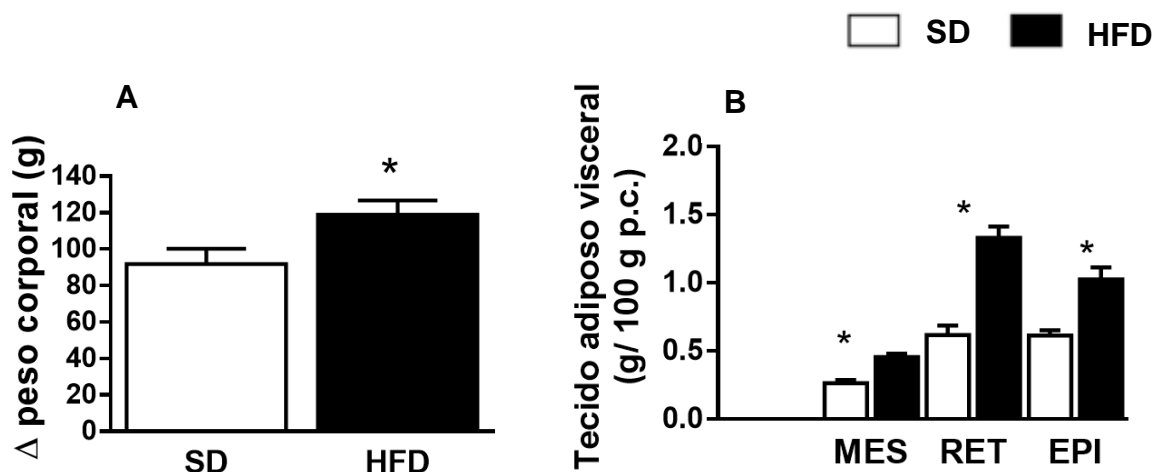
A seguir, serão mencionados os resultados relacionados ao peso corporal, tecido adiposo e índice uterino dos animais, bem como os dados referentes aos experimentos de salivacção e ingestão de água induzidas por pilocarpina em ratos e ratas alimentados com dieta hiperlipídica e dieta padrão.

5.1 Peso corporal e tecido adiposo em ratos alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas

Na semana 0, todos os ratos foram alimentados com SD e não houve diferença significativa entre os dois grupos no peso corporal. Durante o período de 6 semanas, os animais HFD apresentaram ganho de peso significativamente maior que os animais SD. A Figura 1 A mostra esses resultados.

Os ratos alimentados com HFD por 6 semanas apresentaram um maior tecido adiposo epididimal, mesentérico e retroperitoneal, quando comparados com os ratos SD.

Figura 1 – A) Diferença entre peso corporal inicial a final em ratos alimentados com dieta padrão (SD) e ratos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) 6 semanas. B) Alterações no tecido adiposo em ratos alimentados com dieta padrão (SD) e ratos alimentados com dieta hiperlipídica (HFD) por 6 semanas.



Dados estão expressos como média \pm EPM; Teste t seguido do teste Shapiro-Wilk* $p < 0,05$ vs. SD; SD, $n = 9$; HFD, $n = 10$.

Fonte: Elaboração própria.

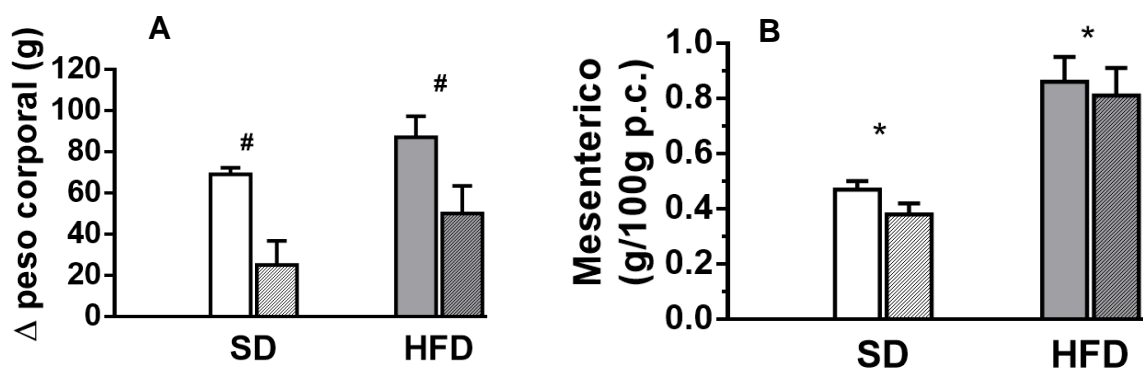
5.2 Peso corporal, tecido adiposo e índice uterino em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica por 6 semanas

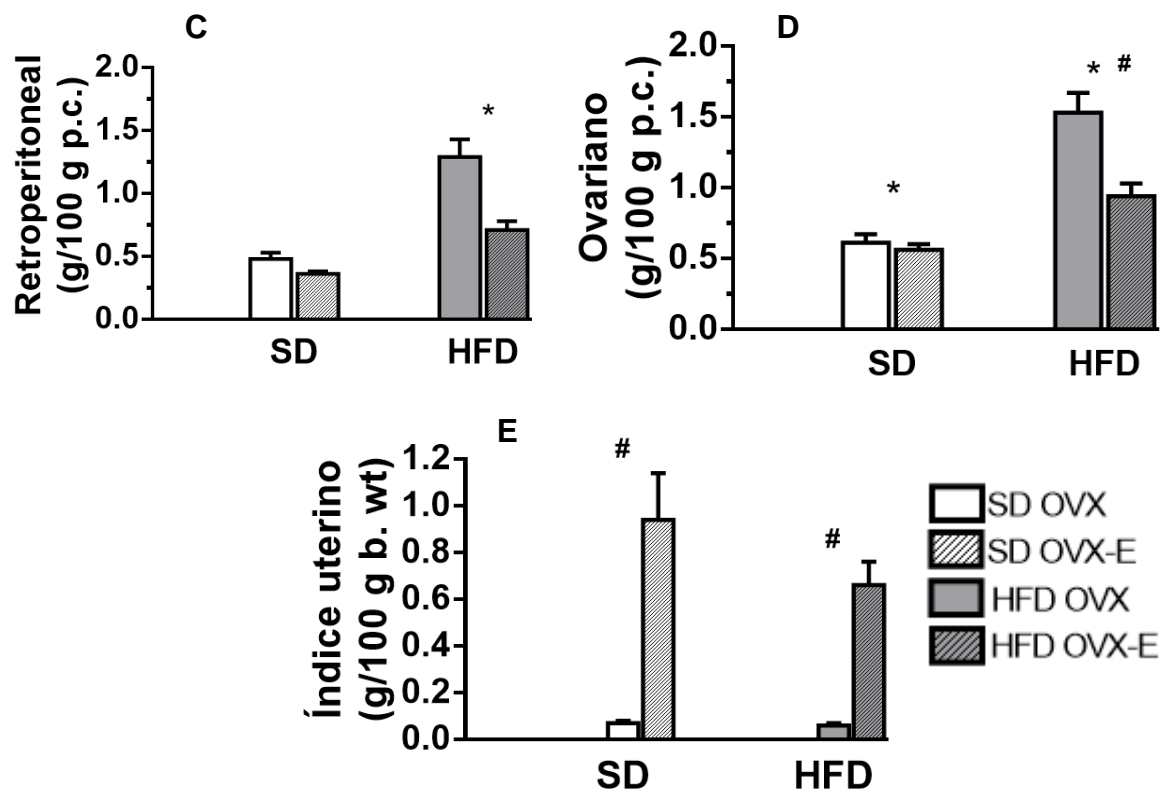
Observamos que o ganho de peso entre as ratas que receberam dieta padrão (SD) e dieta hiperlipídica (HFD) foi semelhante, nas ratas OVX e nas OVX+E2. Porém, podemos verificar que em ambos os grupos, nas ratas OVX houve um maior ganho de peso, que foi revertido pelo tratamento com E2.

Apesar do peso semelhante, podemos ver no gráfico, que as ratas HFD, tiveram maior tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal e ovariano maior do que as ratas SD, em todos os grupos (OVX e OVX+E2). Consideramos como tecido adiposo visceral a soma do tecido adiposo ovariano, mesentérico e retroperitoneal.

Observa-se redução do peso dos ovários nos grupos OVX, independente do tratamento, demonstrando que a cirurgia foi realizada corretamente. Além disso, vê-se o aumento do peso do útero nas ratas em que foi feita a reposição hormonal, demonstrando a eficiência desse tratamento.

Figura 2 – A) Diferença entre peso corporal inicial a final. B) Alterações no tecido adiposo mesentérico C) Alterações no tecido adiposo retroperitoneal D) Alterações no tecido adiposo ovariano E) Índice uterino em ratas alimentadas com dieta padrão (SD) e ratas alimentadas com dieta hiperlipídica (HFD) por 6 semanas), ovariectomizadas (OVX) ou OVX com tratamento com E2 (OVX-E2).





Dados estão expressos como média \pm EPM; Análise de variâncias de uma via seguido do teste Shapiro-Wilk. * $p < 0,05$ vs. SD e # $p < 0,05$ vs. OVX. SD+OVX, $n = 7$; SD+OVX/E2, $n = 7$; HFD+OVX, $n = 8$; HFD+OVX/E2, $n = 8$.

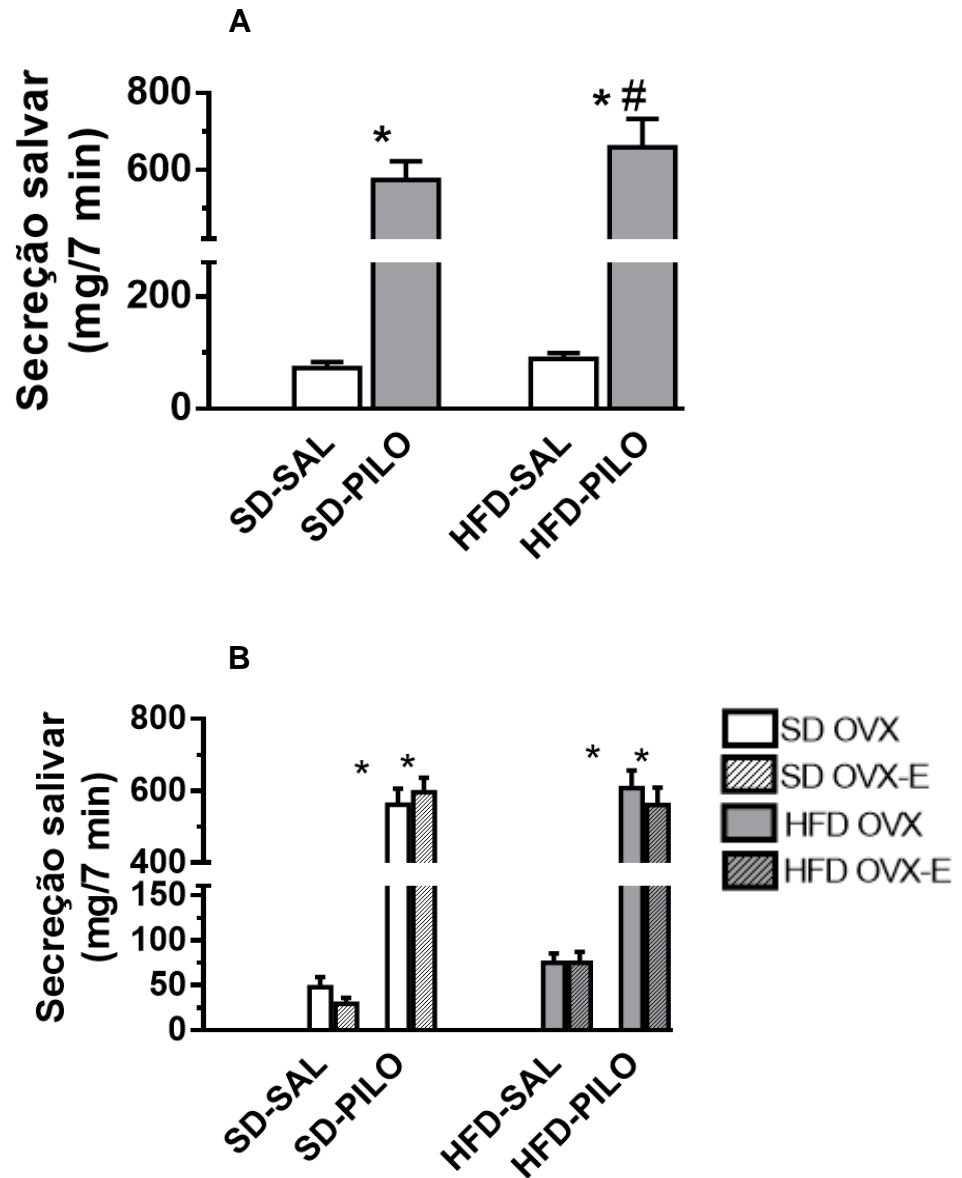
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Salivação induzida por pilocarpina em ratos e ratas alimentados por 6 semanas com dieta hiperlipídica

Observamos que a pilocarpina induziu aumento da secreção salivar em todos os grupos comparada com a secreção salivar controle (injeção de salina ip).

Em ratos, verificamos uma diferença significativa na secreção salivar induzida por pilocarpina entre os grupos SD e HFD. Ainda, observamos uma redução da secreção salivar em ratas OVX e esta redução foi revertida pelo tratamento com estrógeno (OVX/E2), tanto em animais alimentados com dieta hiperlipídica (HFD), quanto com dieta padrão (SD).

Figura 3 – A) Secreção salivar basal (salina) e induzida por pilocarpina em ratos alimentados com dieta padrão (SD) e dieta hiperlipídica (HFD) por 6 semanas B) Secreção salivar induzida por salina ou pilocarpina em ratas alimentadas com dieta padrão (SD) ou dieta hiperlipídica (HFD), ovariectomizadas (OVX) ou OVX com tratamento com E2 (OVX-E2).



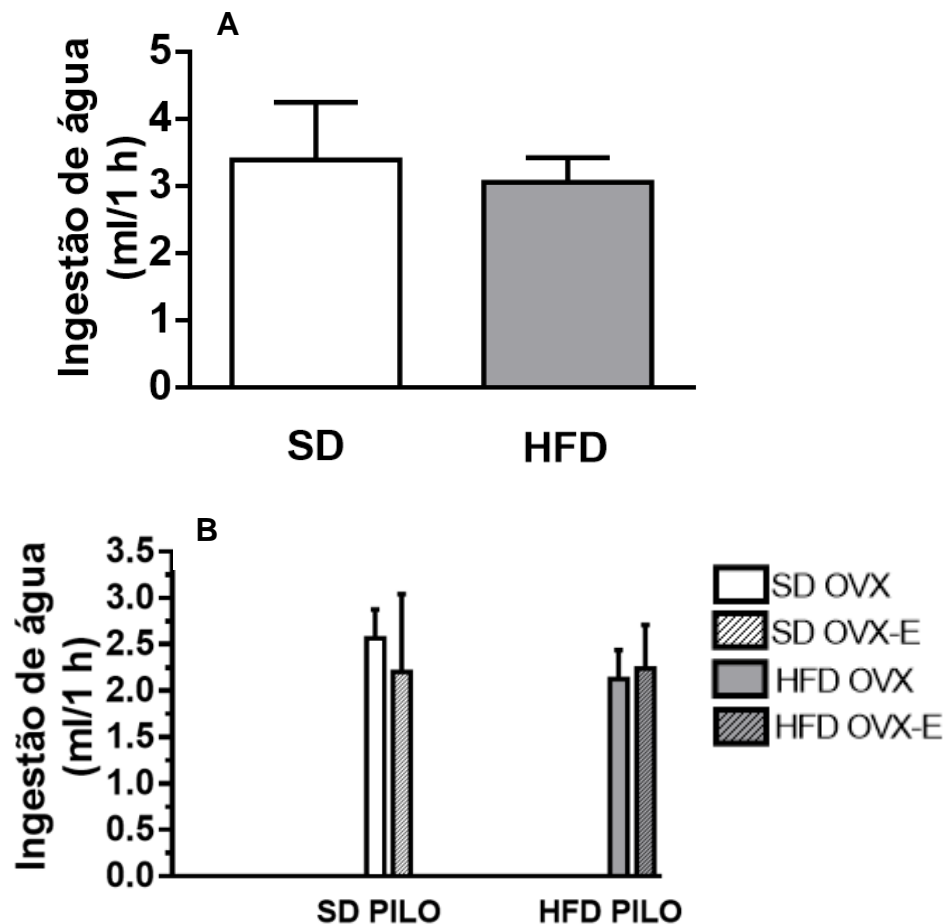
Dados estão expressos como média \pm EPM; Análise de variâncias de duas vias seguido do teste Shapiro-Wilk. * $p < 0,05$ vs. Salina e # $p < 0,05$ vs. SD PILO. A) SD, $n = 13$; HFD, $n = 10$ B) SD+OVX, $n = 7$; SD+OVX/E2, $n = 7$; HFD+OVX, $n = 8$; HFD+OVX/E2, $n = 8$.

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Ingestão de água induzida por pilocarpina em ratos e ratas alimentados por 6 semanas com dieta hiperlipídica

Em ratos alimentados por 6 semanas com dieta hiperlipídica, a ingestão de água induzida por pilocarpina dos animais alimentados com HFD foi similar aos animais alimentados com SD. Nas ratas OVX, seja SD ou HFD, houve uma tendência a redução da ingestão de água, porém sem alterações significantes.

Figura 4 – A) Ingestão de água induzida por pilocarpina em ratos alimentados com dieta padrão (SD) e dieta hiperlipídica (HFD) por 6 semanas B)) Ingestão de água induzida por salina ou pilocarpina em ratas alimentas com dieta padrão (SD) ou dieta hiperlipídica (HFD), ovariectomizadas (OVX) ou OVX com tratamento com E2 (OVX-E2).



Dados estão expressos como média \pm EPM; Teste t seguido do teste Shapiro-Wilk* A) SD, n = 13; HFD, n = 10 B) SD+OVX, n = 7; SD+OVX/E2, n = 7; HFD+OVX, n = 8; HFD+OVX/E2, n = 8

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

As ratas SD e HFD, tiveram ganho de peso semelhante ao longo das 6 semanas se compararmos as diferentes dietas entre os mesmos tratamentos (OVX,OVX/E2). Ademais, a remoção dos ovários aumentou o ganho de peso nas ratas dos dois grupos e a administração de estrógeno preveniu o ganho de peso, o que era de se esperar dado o efeito de aumento do metabolismo basal do estrógeno²⁰. Porém, as ratas alimentadas com HFD, de qualquer um dos grupos, tiveram maior adiposidade do que seus pares SD, mesmo com massa corporal semelhante. Diferentemente dos machos que tem um aumento significativo de massa e de tecido adiposo^{7,11}, as fêmeas tem maior resistência ao aumento de massa, embora tenham aumento de sua adiposidade também demonstrado em outros estudos²⁰. Um dos mecanismos propostos é que as fêmeas conseguem utilizar de forma mais intensa a gordura para produção de energia, ou seja, não é decorrente de uma menor ingestão alimentar²⁹. Ainda, o índice uterino mostra a eficácia da ovariectomia bilateral, bem como o efeito do estrógeno nas ratas ovariectomizadas.

Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que ratos alimentados por 6 semanas com HFD apresentam aumento de peso e de adiposidade^{7,11}. Foi demonstrado que ratos alimentados 8 semanas com HFD contendo aproximadamente 60% de gordura tiveram redução do fluxo salivar estimulado por pilocarpina¹² e as glândulas salivares parótida e submandibular apresentaram vacúolos. Ademais, pacientes obesos tem fluxo salivar mais baixo⁹.

Em ratos machos foi demonstrado que a alimentação com HFD contendo aproximadamente 60% de gordura promoveu hiperglicemia, hiperinsulenemia, resistência à insulina, e redução da secreção salivar induzida por pilocarpina e tiveram redução do fluxo salivar estimulado por pilocarpina na dose de 5 mg/kg¹². Neste mesmo estudo¹², foi verificado a presença de vacúolos nas parótidas e submandibulares, indicando degeneração tecidual. Em humanos obesos de ambos os sexos, sejam jovens ou adultos até os 50 anos, há hipossalivação, que pode estar relacionada, no caso de jovens, ao índice de massa corporal elevado¹¹, enquanto em adultos até 50 anos, à hiperglicemia, que é associada a obesidade¹⁰. Outro estudo que levou em consideração apenas mulheres na pré ou pós-menopausa, verificou que as mulheres na pós-menopausa tinham hipossalivação¹⁹.

Nossa hipótese inicial era que com 6 semanas teríamos uma redução da secreção salivar, seja a basal ou a induzida por pilocarpina. Porém, com 6 semanas os ratos tiveram um aumento da secreção salivar para nossa surpresa. Não sabemos no momento porque houve essa diferença na secreção salivar em ratos. Mais estudos são necessários para sabermos os mecanismos envolvidos, tais como o estudo histológico da presença ou ausência de vacuolos, como feito por Kolodziej et al.¹² ou o estudo da temperatura corporal em ratos em diferentes tempos de alimentação de DH, seja em repouso ou induzido por pilocarpina, uma vez que ratos salivam mais a medida que a temperatura corporal aumenta³⁰.

Em camundongas alimentadas com HFD (60% de gordura) por 3 meses houve autofagia na glândula bem como redução da inervação simpática nas glândulas salivares, as quais podem levar a uma disfunção glandular, embora os autores não tenham verificado o fluxo salivar neste artigo³¹. Em nosso estudo, por outro lado, verificamos que as ratas alimentadas com dieta SD e com ovariectomia (SD+OVX) apresentaram uma redução da secreção salivar induzida por pilocarpina, o qual foi revertida pelo tratamento com estrógeno. Até o momento, este é o primeiro estudo a evidenciar tais alterações em ratas, fortalecendo a conclusão de que a transição para a menopausa e, conseqüentemente, a falta de estrógeno provocam mudanças na secreção salivar. Em contrapartida, em ratas alimentadas com HFD houve uma diminuição na secreção salivar induzida por pilocarpina no grupo em que ocorreu a reposição de estrógeno, quando comparado àquele em que foi feita a ovariectomia. Apesar disso, não houve diferença com o grupo SD.

Ratos alimentados 6 semanas com HFD tiveram ingestão de água induzida pela pilocarpina de magnitude semelhante aos ratos SD. A pilocarpina administrada periféricamente, mas atuando em receptores colinérgicos no sistema nervoso central, induz ingestão de água¹⁷. É possível que a manutenção da HFD tenha causado uma neuroinflamação que alterou a responsividade da pilocarpina nas vias neurais de ingestão de água. Já foi demonstrado que ratos alimentados 6 semanas com DH apresentam neuroinflamação no bulbo⁷ e outros estudos mostram a neuroinflamação no prosencéfalo²³, local onde o processamento da sede se inicia². Outros dados mostram que as citocinas inflamatórias podem ser inibitórias para a ingestão de água²⁴. Desta forma, em ratos alimentados 6 semanas com HFD podem ter um balanço entre a ativação de vias excitatórias para a sede induzida pela pilocarpina, contrarreguladas com mecanismos inibitórios das citocinas inflamatórias.

Sabe-se que o estrógeno é inibitório para a ingestão de água³² e que durante a obesidade há uma redução da ingestão diária de água¹¹ e após a privação hídrica de 24 horas³³, mas não pela injeção intracerebroventricular de angiotensina II, um potente peptídeo dipsogênico¹¹. Observamos no presente projeto que existe uma tendência das ratas ovariectomizadas de ingerirem menos água, independente se alimentadas com dieta SD ou HFD. Mais experimentos deverão ser feitos para entendermos as alterações na ingestão de água induzida pela pilocarpina intraperitoneal.

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostram que ratos alimentados 6 semanas com HFD tiveram aumento na secreção salivar induzida por pilocarpina, enquanto as fêmeas SD têm redução da secreção salivar em situação fisiológica semelhante a menopausa, o que não foi observado em ratas HFD.

Ratos alimentados 6 semanas com HFD tiveram a ingestão de água induzida por pilocarpina de magnitude semelhante aos ratos SD. Observamos que existe uma tendência das ratas ovariectomizadas de ingerirem menos água, independente se alimentadas com dieta SD ou HFD.

REFERÊNCIAS*

1. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019; 15(5): 288-98.
2. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 904: 502-6.
3. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. *Vigitel Brasil 2020: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde; 2021.
4. Jensen VS, Tveden-Nyborg P, Zacho-Rasmussen C, Quaade ML, Ipsen DH, Hvid H et al. Variation in diagnostic NAFLD/NASH read-outs in paired liver samples from rodent models. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2020; 101: 106651.
5. Speretta GF, Silva AA, Vendramini RC, Zanesco A, Delbin MA, Menani JV et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci*. 2016; 146: 154-62.
6. González-Muniesa P, Martínez-González MA, Hu FB, Després JP, Matsuzawa Y, Loos RJF et al. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17034.
7. Speretta GF, Ruchaya PJ, Delbin MA, Melo MR, Li H, Menani JV, Sumners C et al. Importance of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of the solitary tract in cardiovascular responses induced by a high-fat diet. *Hypertens Res*. 2019; 42(4): 439-49.
8. Flink H, Bergdahl M, Tegelberg A, Rosenblad A, Lagerlöf F. Prevalence of hyposalivation in relation to general health, body mass index and remaining teeth in different age groups of adults. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2008; 36(6): 523-31
9. Modéer T, Blomberg CC, Wondimu B, Julihn A, Marcus C. Association between obesity, flow rate of whole saliva, and dental caries in adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. 2010; 18(12): 2367-73
10. Schwenger KJP, Alghamdi MM, Ghorbani Y, Jackson TD, Okrainec A, Allard JP. Hyposalivation is prevalent in bariatric patients but improves after surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2020; 16(10): 1407-13
11. Sá JM, Barbosa RM, Menani JV, De Luca LA Jr, Colombari E, Almeida Colombari DS. Cardiovascular and hidroelectrolytic changes in rats fed with high-fat diet. *Behav Brain Res*. 2019; 373: 112075

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Kołodziej U, Maciejczyk M, Miąsko A, Matczuk J, Knaś M, Żukowski et al. Oxidative Modification in the Salivary Glands of High Fat-Diet Induced Insulin Resistant Rats. *Front Physiol.* 2017; 8: 20
13. 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
14. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. *J Oral Rehabil.* 2018; 45(9): 730-46.
15. Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 75(2): 186-91.
16. Freedman SB, Harley EA, Patel S. Direct measurement of muscarinic agents in the central nervous system of mice using ex vivo binding. *Eur J Pharmacol.* 1989; 174(2-3): 253-60.
17. Gay PE, Benner SC, Leaf RC. Drinking induced by parenteral injections of pilocarpine. *Pharmacol Biochem Behav.* 1976; 5(6):633-8.
18. Renzi A, Colombari E, Mattos Filho TR, Silveira JE, Saad WA, Camargo LA et al.. Involvement of the central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats. *J Dent Res.* 1993; 72(11): 1481-4.
19. Pérez-González A, Suárez-Quintanilla JA, Otero-Rey E, Blanco-Carrión A, Gómez-García FJ, Gándara-Vila P et al. . Association between xerostomia, oral and general health, and obesity in adults. A cross-sectional pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2021; 26(6): e762-9.
20. De Jesus AN, Henry BA. The role of oestrogen in determining sexual dimorphism in energy balance. *J Physiol.* 2023; 601(3): 435-49.
21. Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* 2006; 444(7121): 881-7.
22. Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005; 73(1): 9-15.
23. de Kloet AD, Pioquinto DJ, Nguyen D, Wang L, Smith JA, Hiller H et al.. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. *Physiol Behav.* 2014; 136: 31-8.
24. De Castro E Silva E, Luz PA, Magrani J, Andrade L, Miranda N et al. . Role of the central opioid system in the inhibition of water and salt intake induced by central administration of IL-1beta in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 83(2): 285-95.
25. McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 1-6.

26. Paulin RF, Menani JV, Colombari E, De Paula PM, Colombari DS. Role of the medial septal area on pilocarpine-induced salivary secretion and water intake. *Brain Res.* 2009; 1298: 145-52.
27. Almeida-Pereira G, Rorato R, Reis LC, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. The role of estradiol in adrenal insufficiency and its interaction with corticosterone on hydromineral balance. *Horm Behav.* 2013; 64(5): 847-55.
28. Pereira, E. D., R. M. Dantas, G. M.F Andrade-Franzé, L. A. De Luca, J. V. Menani, e C. A.F Andrade. *Estradiol Modulates the Palatability of 0.3 M NaCl in Female Rats During Sodium Appetite.* 2019.
29. Orah J, Enriquez RF, Herzog H, Lee NJ. Sex-specific changes in metabolism during the transition from chow to high-fat diet feeding are abolished in response to dieting in C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond).* 2022; 46(10): 1749-58.
30. Furuyama F, Murakami M, Oiwa T, Nishino H. Differences in thermal salivation between the FOK rat (a model of genotypic heat adaptation) and three other rat strains. *Physiol Behav.* 1998; 63(5): 787-93.
31. de Carvalho PM, Gavião MB, Carpenter GH. Altered autophagy and sympathetic innervation in salivary glands from high-fat diet mice. *Arch Oral Biol.* 2017; 75: 107-13.
32. Santollo J, Daniels D. Multiple estrogen receptor subtypes influence ingestive behavior in female rodents. *Physiol Behav.* 2015; 152(Pt B): 431-7.
33. Dos-Santos RC, Ishioka G, Cognuck SQ, Mantovani M, Caliman IF, Elias LLK et al. High-fat diet changes the behavioural and hormonal responses to water deprivation in male Wistar rats. *Exp Physiol.* 2022; 107(12): 1454-66.

ANEXO A – CERTIFICADO BOLSAS PIBIC

		
UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"		
Certificado		
<p>Certifico que Helena Oliveira Deróbio, portador(a) do CPF número 475.260.108-74, desenvolveu a pesquisa "Efeito da ingestão de dieta hiperlipídica por diferentes períodos na secreção salivar e na ingestão de água induzida por pilocarpina em ratos" no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp, na modalidade Bolsa PIBIC CNPq, no período de 01/09/2020 a 31/08/2021, na(o) Faculdade de Odontologia de Araraquara da Unesp, sob a supervisão do(a) Professor(a) Debora Simoes de Almeida Colombari.</p>		
<p>São Paulo, 25 de outubro de 2023</p>		
 Edson Cocchieri Botelho Pró-Reitor de Pesquisa Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"		

		
UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"		
Certificado		
<p>Certifico que Helena Oliveira Deróbio, portador(a) do CPF número 475.260.108-74, desenvolveu a pesquisa "Efeito da ingestão de dieta hiperlipídica na secreção salivar induzida por pilocarpina em fêmeas: participação do estrógeno" no âmbito do PIBIC - Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Unesp, na modalidade Bolsa PIBIC CNPq, no período de 01/09/2021 a 31/08/2022, na(o) Faculdade de Odontologia de Araraquara da Unesp, sob a supervisão do(a) Professor(a) Debora Simoes de Almeida Colombari.</p>		
<p>São Paulo, 25 de outubro de 2023</p>		
 Edson Cocchieri Botelho Pró-Reitor de Pesquisa Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"		