

Lilian Fraga Costa

ESTUDO DA ATIVIDADE SALIVAR EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

ARAÇATUBA - SP
2009

Lilian Fraga Costa

ESTUDO DA ATIVIDADE SALIVAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de MESTRE EM
ODONTOPEDIATRIA

Orientadora: Profª. Dra. Cristina Antoniali Silva

ARAÇATUBA - SP
2009

Dedicatória

Dedicatória

Ao meu Pai,

Que no meio de tantas incertezas, mostrou minhas virtudes,
capacidades e limites. Me apontou possibilidades para o futuro,

dedico este trabalho.

Agradecimentos
Especiais

Agradecimentos Especiais

À minha Mãe,

Pelo amor incondicional, paciência sem fim e exemplo de mulher.

“Teus braços sempre se abrem quando preciso um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso uma amiga. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar.”

Ao Davi,

Por tantas ligações, cuidados e companheirismo.

“Para estar junto não é preciso estar perto, e sim do lado de dentro.”

Às minhas irmãs e meu irmão,

Pelas alegrias, torcida e amizade.

“A nossa felicidade será naturalmente proporcional em relação à felicidade que fizermos para os outros.”

À minha orientadora Profa. Dra. Cristina Antoniali Silva,

Pela enorme dedicação, incentivo e experiência.

“Respeito é algo que se conquista pela admiração...”

Às “Danis”,

Por toda ajuda e convivência.

“Fácil é ser colega, fazer companhia a alguém, dizer o que ele deseja ouvir. Difícil é ser amigo para todas as horas e dizer sempre a verdade quando for preciso.”

Obrigada!!!

Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, nas pessoas de seu Diretor Prof. Tit. Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia;

ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba–UNESP, na pessoa de seu Coordenador Prof. Adj. Robson Frederico Cunha;

ao Prof. Adj. Alberto Carlos Botazzo Delbem;

à Profa. Dra. Kikue Takebayashi Sasaki;

aos docentes, funcionários e técnicos do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP;

aos colegas do curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP;

à funcionária da Disciplina de Odontopediatria, Maria;

ao funcionário do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Marcelinho;

aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP;

ao CNPq;

à FAPESP.

Obrigada!!!

Epígrafe

Epígrafe

***“Aprender é a única de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”***

Leonardo da Vinci

Sumário

Sumário

1. Introdução	22
2. Proposição	29
3. Materiais e Métodos	31
4. Resultados	39
5. Discussão	53
6. Conclusão	70
Referências Bibliográficas	72

Lista de Figuras

Figura 01- PAS de ratos jovens em mmHg	40
Figura 02- Peso dos ratos em gramas	41
Figura 03- Fluxo salivar dos ratos em mL/min	42
Figura 04- Fluxo salivar dos ratos em mL/min/100g	43
Figura 05- pH da saliva dos ratos	44
Figura 06- Capacidade tamponante da saliva de ratos em mL acido láctico/100mL saliva	45
Figura 07- Concentração de fluoreto na saliva de ratos em $\mu\text{gF/mL}$	46
Figura 08- Concentração de íons cálcio na saliva de ratos em $\mu\text{gCa/mL}$	48
Figura 09- Concentração de proteínas totais na saliva de ratos em mg/mL	49
Figura 10- Concentração de amilase saliva de ratos	50
Figura 11- Concentração de IgA na saliva de ratos em mg/dL	51

Lista de Tabelas

Tabela 01- Fluxo salivar de ratos Wistar e ratos SHR, em mL/min	42
Tabela 02- pH da saliva de ratos Wistar e ratos SHR	44
Tabela 03- Concentração de Fluoreto na saliva de ratos Wistar e ratos SHR, em $\mu\text{gF/mL}$.	46
Tabela 04- Concentração de Íons Cálcio na saliva de ratos Wistar e ratos SHR, em $\mu\text{gCa/mL}$.	47
Tabela 05- Concentração de IgA na saliva de ratos Wistar e ratos SHR, em mg/dL	51

Lista de Abreviaturas

SHR – Rato Espontaneamente Hipertenso

W – Rato Wistar-Kyoto

3M – 3 meses

30d – 30 dias

PA – Pressão Arterial

EPM – Erro Padrão da Média

Resumo

Resumo

A saliva mantém a integridade e saúde do ambiente bucal. Alterações em sua composição e atividade, associadas à hipertensão, poderiam favorecer aparecimento de patologias sistêmicas e na cavidade bucal. O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros bioquímicos da saliva de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) aos 30 dias de vida (30d) e aos 3 meses (3M). Nos experimentos foram utilizados ratos machos Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR), aos 30 dias e 3 meses de vida. A medida da pressão arterial sistólica foi realizada pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos. Para a coleta da saliva os animais, sobre efeito de anestesia e estimulados com nitrato de pilocarpina, foram colocados em prancha inclinada e a saliva foi coletada em beakers, mantidos em gelo, por 15 minutos. Para a medida do pH foi utilizado eletrodo específico acoplado ao pHmetro calibrado, a capacidade tamponante foi calculada de acordo com o volume de ácido láctico utilizado para reduzir o pH da amostra até 4. As concentrações de fluoreto ($[F^-]$) e íons cálcio ($[Ca^{++}]$) foram determinadas com eletrodos específicos e microeletrodos de referência acoplados a analisadores iônicos. A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry e a atividade da amilase salivar foi medida através de método cinético, utilizando kit comercial. A dosagem de IgA foi feita através da leitura de absorbância pelo espectrofotômetro, através kit comercial. O fluxo salivar estimulado foi menor nos ratos hipertensos de 3 meses, quando comparado aos ratos normotensos Wistar (SHR: $0,015 \pm 0,002 \text{ mL/min/100g}$; W: $0,025 \pm 0,002 \text{ mL/min/100g}$). O pH salivar está aumentado no grupo dos SHR de 3 meses ($8,3 \pm 0,06$) em relação aos ratos normotensos com o mesmo tempo de vida ($7,9 \pm 0,09$), entre os ratos filhotes (30d) não houve diferenças significativas (SHR: $8,3 \pm 0,03$, W: $8,1 \pm 0,07$). A capacidade tamponante não foi alterada pelo desenvolvimento tanto nos ratos SHR (30d: $35,9 \pm 2,2$; 3M: $43,2 \pm 1,7 \text{ mL}$) quanto nos Wistar (30d: $47,7 \pm 3,6$ 3M: $51,07 \pm 5,2 \text{ mL}$), porém entre os ratos jovens (3M) a hipertensão reduziu este parâmetro. As concentrações de fluoreto e íons cálcio foram aumentadas com o desenvolvimento no grupo dos ratos normotensos ($[F^-]$ = 30d: $0,015 \pm 0,001$; 3M: $0,053 \pm 0,007 \mu\text{g/mL}$; $[Ca^{++}]$ = 30d: $4,9 \pm 0,6$; 3M: $30,9 \pm 4,8$

$\mu\text{g/mL}$), o que não ocorreu entre grupo de ratos com hipertensão ($[\text{F}^-]$ = 30d: $0,011\pm 0,001$; 3M: $0,022\pm 0,005\mu\text{g/mL}$; $[\text{Ca}^{++}]$ = 30d: $3,8\pm 0,46$; 3M: $4,9\pm 0,42\mu\text{g/mL}$). A concentração de proteínas totais entre os ratos hipertensos (30d: $0,80\pm 0,16$; 3M: $1,66\pm 0,21\mu\text{g/mL}$) foi aumentada com o desenvolvimento dos animais, o que não foi observado entre os ratos normotensos (30d: $1,06\pm 0,16$; 3M: $1,33\pm 0,16\mu\text{g/mL}$). A atividade da amilase salivar foi aumentada com o desenvolvimento dos ratos normotensos (30d: $0,33\pm 0,058\text{U/mL}$; 3M: $0,74\pm 0,052\text{U/mL}$), porém entre os SHR não houve alteração (30d: $0,49\pm 0,0823$; 3M: $0,58\pm 0,083\text{U/mL}$). Os valores de concentração de IgA não foram significativamente diferentes entre os grupos.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que SHR são modelos experimentais de hipofunção salivar uma vez que o desenvolvimento do animal não alterou o reduzido fluxo salivar estimulado pelo agonista muscarínico observado desde os 30 dias de vida. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram também, pela primeira vez, que SHR são animais que apresentam alteração na secreção salivar de íons fluoreto. Uma vez que a secreção salivar de fluoreto depende da absorção de fluoreto de fontes externas (água e alimentos) e do desenvolvimento dos animais, que aumenta a quantidade de íons fluoreto secretado na saliva, SHR possivelmente apresentam alterações na absorção ou na distribuição destes íons pelos compartimentos orgânicos. Assim como a hipertensão em SHR está associada a redução da homeostase de cálcio no plasma, e como foi demonstrado neste estudo, ao cálcio salivar, fatores associados a hipertensão poderiam também estar influenciando a homeostase do flúor nestes animais.

Abstract

Abstract

Saliva plays an important role in the maintenance of a healthy oral environment. Hypertension and aging could interfere with salivary activity, leading to systemic and oral diseases. The aim of this study was to evaluate whether the effects of maternal hypertension on salivary activity of SHR pups are carried to the animal's adult life. The study was conducted employing 30-day-old (30d) male pups of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar rats (W); and 3 months-old male (3M) SHR and Wistar rats. The systolic blood pressure of 3 months-old male SHR and Wistar rats and female SHR and Wistar rats before mating was recorded by indirect tail-cuff plethysmography. Thirty-day-old (pups) and 3-months-old (young) male rats, after a 12-hour fasting, were anesthetized with xylazine and ketamine. The salivary flow (SF) was stimulated by pilocarpine nitrate. Saliva collection was performed according to Bernardes' method. Immediately after the saliva was collected, the salivary pH was measured with specific electrode connected to pHmetro priory calibrated. The salivary buffer capacity was calculated according to the volume of lactic acid (0,1 mol/L) spent to reduce the salivary pH to 4,0. The saliva protein concentration was determined using the Lowry method, and salivary amylase activity was measured using the kinetic method. The concentration of fluoride ($[F^-]$) and calcium ($[Ca^{++}]$) was measured using specific electrode connected to a digital ion-analyzer previously calibrated with standard solutions. Results: The salivary flow of 3 months old SHR was lower than the normotensive rats (SHR: $0,015 \pm 0,002$ mL/min/100g; W: $0,025 \pm 0,002$ mL/min/100g). pH was higher in 3 months old SHR group ($8,3 \pm 0,06$) when compared to normotensive rats ($7,9 \pm 0,09$) at the same age; between the pups there was no difference in pH values (SHR: $8,3 \pm 0,03$, W: $8,1 \pm 0,07$). The salivary buffer capacity was not altered by animal development in SHR (30d: $35,9 \pm 2,2$; 3M: $43,2 \pm 1,7$ mL) and Wistar (30d: $47,7 \pm 3,6$ 3M: $51,07 \pm 5,2$ mL), but among the 3 months old rats hypertension diminished this parameter. The fluoride and calcium concentrations increased with aging in normotensive rats ($[F^-]$ = 30d: $0,015 \pm 0,001$; 3M: $0,053 \pm 0,007$ μ g/mL; $[Ca^{++}]$ = 30d: $4,9 \pm 0,6$; 3M: $30,9 \pm 4,9$ μ g/mL), in the SHR group there was no difference

between pups and young rats ($[F^-]$ =(30d: $0,011\pm 0,001$; 3M: $0,022\pm 0,005\mu\text{g/mL}$; $[Ca^{++}]$ = 30d: $3,8\pm 0,46$; 3M: $4,9\pm 0,42\mu\text{g/mL}$). The animal development increased the salivary protein concentration in SHR (30d: $0,80\pm 0,16$; 3M: $1,66\pm 0,21\mu\text{g/mL}$), but the Wistar rats showed no difference (30d: $1,06\pm 0,16$; 3M: $1,33\pm 0,16\mu\text{g/mL}$). The amylase activity of normotensive rats increased with development (30d: $0,33\pm 0,058$; 3M: $0,74\pm 0,0528\text{U/mL}$), but SHR showed no difference (30d: $0,49\pm 0,082$; 3M: $0,58\pm 0,0833\text{U/mL}$). There was no difference of IgA concentration among all groups. This data supports other studies that showed decreased SF on SHR stimulated either by muscarinic or adrenergic agonist, regardless of age. As salivary fluoride originates from the water and feeding, our data shows that Wistar's development is associated with higher absorption of fluoride. Therefore, development may not affect the fluoride absorption on SHR. Our results show that age increases the saliva calcium concentration in Wistar rats, which is not observed in SHR. It has been demonstrated that, in SHR, hypertension is followed by a reduction in ionized serum calcium homeostasis. As development increases the biochemical parameters of saliva in the normotensive rats, SHR could be a good experimental model of salivary gland hypofunction.

1. Introdução

1. Introdução

A secreção salivar é fisiologicamente controlada pelo sistema nervoso autônomo, e volume de saliva produzido pode variar em função do tipo e da intensidade do estímulo, ocorrendo secreção dos maiores volumes por estimulação colinérgica. A partir da ligação de neurotransmissores em receptores específicos, acoplados a proteínas G, nas membranas das células acinares das glândulas salivares, são subseqüentemente iniciados eventos intracelulares associados à formação de segundos mensageiros. Com o estímulo colinérgico, os receptores muscarínicos acoplados a proteínas G são ativados, há a formação de inositol trifosfato (IP3) como segundo mensageiro e liberação de cálcio de estoques intracelulares, com subseqüente ativação de canais iônicos e transportadores envolvidos no movimento trans-epitelial de água¹.

A saliva é produzida por três pares principais de glândulas salivares (parótida, submandibular e sublingual) e por numerosas outras glândulas salivares menores, sendo composta em mais de 99% de água e menos de 1% de componentes sólidos, que são principalmente proteínas, representadas por enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, mucinas, traços de albumina e alguns polipeptídios e oligopeptídios. Imunoglobulinas, enzimas e outras proteínas desempenham ação antibacteriana; proteínas macromoleculares e mucinas são responsáveis pela lubrificação, proteção contra desidratação, manutenção da viscoelasticidade salivar, modulação da adesão de microorganismos na superfície de tecidos orais, o que contribui no controle da adesão de fungos e bactérias. Eletrólitos, como sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio, bicarbonato e fosfato e também derivados do nitrogênio, como amônia e uréia são componentes importante da saliva^{2,3} Estes desempenham funções como: (1) bicarbonatos, fosfatos e uréia agem regulando o pH e capacidade tampão da saliva; (2) cálcio e fosfato, junto com as proteínas, são fatores antisolubilizantes e modulam a desmineralização e remineralização dental⁴. Os componentes salivares, particularmente as proteínas, são multifuncionais (apresentando mais de uma função), redundantes (desempenham funções similares, porém com diferente extensão/propósito), e podendo agir a favor e contra o hospedeiro⁵.

A saliva se comporta como sistema tampão para proteger a cavidade oral, prevenindo a colonização de microorganismos patogênicos, neutralizando e removendo ácidos produzidos por microorganismos acidogênicos, evitando a desmineralização do esmalte^{2,3}. O tampão salivar é mediado pelo sistema carbonato-bicarbonato que se difunde na placa e age ali neutralizando ácidos, além de gerar amônia que também apresenta atividade tamponante; e pelo sistema fosfato-protéico^{4,6}. Enquanto o bicarbonato atua no tamponamento, o fosfato junto com o cálcio agem na manutenção da integridade mineral do dente.

A integridade físico-química do esmalte do dente dentro do ambiente oral depende totalmente da composição e do comportamento químico dos fluídos adjacentes. Os principais fatores que controlam a estabilidade da apatita do esmalte são o pH e as concentrações ativas livres de cálcio, fosfato e flúor em solução⁷. O pH e a composição iônica podem também influenciar a atividade dos componentes orgânicos da saliva.

O flúor presente no organismo depende de fontes externas, da dieta. Cerca de 80- 90% da absorção do flúor ocorre no trato gastrointestinal, sendo o restante não absorvido e eliminado junto com as fezes⁸. O pico da concentração plasmática de fluoreto ocorre após 20 - 60 minutos a ingestão, ocorrendo uma rápida queda dessa concentração devido a distribuição deste fluoreto nos rins e nos tecidos calcificados⁹. O flúor presente no esmalte dental reflete o nível de exposição ao flúor durante a formação dental, já o flúor presente na dentina e também nos ossos são geralmente proporcionais ao consumo de flúor em longo prazo. A concentração plasmática de fluoreto pode ser estimada baseada na análise da saliva presente nos ductos salivares, porém a saliva total presente na cavidade oral possui concentração variável de fluoreto, sendo maior que a concentração plasmática devido à contaminação exógena pela água, alimentos, produtos dentais e pelo fluoreto presente na placa dental⁹. O efeito protetor do flúor contra as cáries depende da ingestão aumentada, tanto antes como após a erupção dentária, o que indica uma multiplicidade de funções do flúor no dente, como melhorar a morfologia do dente, incorporar-se à estrutura do esmalte, tornando-o menos solúvel no meio ácido, inibir enzimas bacterianas que poderiam participar da cariogênese,

remineralização das lesões cáries incipientes, e até mesmo, uma capacidade de modificar o formato de cicatrículas, fóssulas e fissuras.¹⁰

Assim como o flúor, todo o cálcio que o organismo necessita provém da dieta/ metabolismo, a partir da absorção gastrointestinal¹⁰. Os tecidos mineralizados como ossos e dentes, são reservatórios de cálcio. Quando a calcemia, concentração plasmática de cálcio, está alterada, ocorre a movimentação do cálcio e processos de “troca” entre o cristal de hidroxiapatita e o meio extracelular. Havendo a diminuição da concentração plasmática de cálcio ocorre uma saída acelerada de cálcio dos dentes e ossos para o meio extracelular; o inverso ocorre quando a concentração de cálcio está aumentada no extracelular e o cálcio é captado pelo cristal¹⁰. A presença do cálcio na saliva é de extrema importância para o processo de remineralização do dente¹¹. É um íon secretado juntamente com proteínas exclusivamente pelas glândulas salivares, sendo sua concentração na saliva influenciada pelo fluxo salivar, mas não sendo diretamente afetada pelo metabolismo³. O cálcio é encontrado na saliva de duas formas: ligado a proteínas e livre ionizado, dependendo do pH salivar. Sua forma iônica participa do desafio cariogênico, estabelecendo equilíbrio entre os fosfatos de cálcio do tecido duro e seu líquido adjacente. Metade da concentração do cálcio salivar é encontrada na forma iônica, mas essa porcentagem aumenta conforme o pH da saliva diminui, sendo que em valores de pH abaixo de 4 quase que a totalidade do cálcio salivar encontra-se na forma livre ionizada². Doenças como a fibrose cística e alguns medicamentos como a pilocarpina podem causar o aumento dos níveis de cálcio na saliva³.

A atividade antimicrobiana salivar inclui os efeitos da saliva na redução da adesão e da colonização microbiana na superfície do dente e ação de proteínas antimicrobianas específicas. Estas proteínas incluem a lisozima, lactoferrina, enzima peroxidase e proteínas ricas em histidina. Além disso, outros componentes como mucinas, glicoproteínas, fibronectina, β_2 -macroglobulina, lisozima e imunoglobulinas (s-IgA) podem aglutinar bactérias e aumentar o poder de limpeza da saliva. A imunoglobulina A é o maior componente imunológico presente na saliva, esta imunoglobulina tem a capacidade de neutralizar vírus, bactérias e toxinas enzimáticas. A IgA também serve de anticorpo para antígenos bacterianos e é capaz de agregar bactérias,

inibindo a aderência a tecidos orais^{4,12,13,14}. Em menores quantidades IgG e IgM, provenientes do fluido gengival, também estão presentes na saliva^{3,15}. Embora imunoglobulinas salivares estejam presentes, pouco é conhecido sobre seus efeitos na atividade anticárie (*apud* 16).

A hipofunção (redução da atividade) da glândula salivar poderá resultar em hiposalivação (redução do fluxo salivar) ou em xerostomia (secura na boca)². Diabetes, desnutrição, bulimia, anorexia nervosa, doenças autoimunes e reumáticas, radioterapia, mudanças hormonais e também alguns medicamentos são as principais causas da hipofunção da glândula salivar. Diminuição do fluxo salivar, redução da capacidade tamponante da saliva e dos constituintes salivares, particularmente proteínas, são algumas das conseqüências geradas por esta hipofunção. A composição salivar está diretamente relacionada com o fluxo, com o aumento das taxas de fluxo salivar as concentrações de proteína total, Na⁺, cálcio total, Cl⁻ e HCO₃⁻ aumentam em várias extensões, enquanto que a concentração de fosfato total diminui², mostrando que o fluxo desempenha importante papel na redução da atividade cariogênica através da limpeza oral, da capacidade tamponante e dos componentes antimicrobianos. Na hipofunção da glândula salivar, a atividade das lesões de cárie está freqüentemente aumentada e a taxa de progressão da desmineralização é alta. Ambos os componentes orgânicos e inorgânicos da saliva estão envolvidos na função biológica desta que é de importância fundamental para a saúde oral.

Estudos em humanos e em animais têm demonstrado a importância da saliva na manutenção da integridade/ saúde do ambiente oral. Quaisquer alterações na atividade salivar poderiam favorecer patologias que teriam conseqüências graves tanto para a saúde oral e quanto para a sistêmica. Com isso, a avaliação da atividade salivar durante períodos de vida de humanos/animais poderia fornecer informações importantes para possíveis intervenções clínicas que pudessem restabelecer a saúde oral.

A prevalência da hipertensão aumenta com a idade, e o tratamento desta doença pode contribuir para a secura da boca pelos efeitos farmacológicos específicos de algumas drogas comumente prescritas para este tratamento. Aproximadamente 55 milhões de americanos tem hipertensão e 60-70% destes pacientes recebem terapia anti-hipertensiva. A prevalência da

hipertensão é muito maior em idosos, com índices maiores de 42% e 50% para homens e mulheres brancos na idade de 65 a 70 anos. Estudos da diminuição salivar em pacientes hipertensos têm sido suplementados com sugestões de que mais de 40% dos pacientes que tomam medicamentos anti-hipertensivos reportaram complicações subjetivas de secura bucal¹⁷. A hipertensão pode também aparecer durante a gravidez, e não sendo controlada evoluir para hipertensão materna severa (pré-eclampsia e eclampsia). Parto prematuro para idade gestacional e crescimento fetal alterado podem ser conseqüências da hipertensão materna.

A restrição de nutrição intra-uterina ou pós-natal tem sido associada à redução de atividade salivar observada em humanos e em animais¹⁸. A hipertensão arterial durante a gravidez assim como a insuficiência placentária são consideradas fatores patogênicos que levam a restrição de nutrição/crescimento intra-uterino.

Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são modelos experimentais que independentemente de intervenções nutricionais, cirúrgicas ou endócrinas apresentam restrição de crescimento intra-uterino^{19,20}. Recentemente, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que filhotes de 30 dias de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) apresentam uma significativa redução da atividade salivar associada ao pequeno fluxo salivar estimulado por nitrato de pilocarpina (agonista muscarínico), diminuída concentração de proteínas totais, mas sem alteração na atividade da amilase ou no peso das glândulas salivares parótidas, submandibulares e sublinguais²¹. A partir destes resultados, foi sugerido que a hipoatividade salivar observada em filhotes SHR estaria associada à restrição de nutrição intra-uterina dependente da hipertensão materna, uma vez que nesta idade os filhotes não apresentam alteração de pressão arterial. Ratos SHR nascem normotensos com pressão arterial (PA) média em torno de 112mmHg e desenvolvem espontaneamente, ou sem nenhuma causa aparente pré-determinante, um aumento da PA a partir da 8ª semana de nascimento, aumento este que pode chegar a valores próximos de 200mmHg com 12 semanas de idade^{22,23,24}.

Tem sido sugerido que o um evento adverso ocorrido no período de desenvolvimento fetal promoveria efeitos duradouros observados por toda a vida do animal (“programming”)²⁵. A redução da atividade salivar dos filhotes

SHR associada à hipertensão materna poderia ser mantida durante vida adulta do animal. No entanto, os estudos sobre a atividade salivar de ratos SHR adultos não são conclusivos e resultados controversos são apresentados. Corroborando a hipótese levantada, estudo demonstrou que ratos SHR de 22 semanas salivam menos que ratos normotensos (Wistar-Kyoto) em resposta a injeção intraperitoneal de nitrato de pilocarpina²⁶. Também foi observado que a atividade das glândulas salivares (parótidas), estimulada por isoproterenol (agonista β -adrenérgico) ou fluoreto estaria diminuída em SHR velhos (16-18 semanas), porém, neste mesmo estudo, resultados contrários demonstraram que a atividade salivar, estimulada por isoproterenol, estaria aumentada em ratos SHR jovens (6-8 semanas) quando comparada a seus respectivos controles normotensos²⁷. Nos estudos citados, a atividade salivar dos animais foi avaliada apenas por experimentos que compararam a quantidade de secreção salivar estimulada por agonistas ou a concentração de proteínas secretadas na saliva, sem, no entanto, haver uma avaliação detalhada da qualidade da saliva secretada.

2. Proposição

2. Proposição

A partir das evidências citadas, não seria possível obter uma conclusão sobre o efeito da hipertensão materna na atividade salivar de seus descendentes. Novos estudos deveriam ser conduzidos a fim de ser reavaliada a atividade salivar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), determinando se possíveis alterações poderiam ser observadas em diferentes idades destes animais. A partir de uma metodologia adequada e padronizada, pudemos comparar a atividade salivar entre ratos espontaneamente hipertensos e normotensos em diferentes idades.

A proposta do presente trabalho foi avaliar os parâmetros bioquímicos da saliva de ratos pré-hipertensos (ratos SHR com 30 dias de vida), hipertensos aos 3 meses e normotensos, aos 30 dias e 3 meses de vida.

3. Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

Animais experimentais

Nos experimentos foram utilizados filhotes machos, 30 dias de vida, de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) e de ratas normotensas Wistar; e ratos jovens machos (3 meses) Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR).

Os ratos Wistar foram fornecidos pelo biotério do Campus da Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP. Os ratos SHR eram provenientes de uma cepa mantida pelo biotério do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP.

Todos os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24°C) com ciclo de luz (12 h/luz e 12 h/escuro) no biotério do referido departamento e receberam ração padrão e água “*ad libitum*”.

O rato espontaneamente hipertenso foi utilizado neste experimento por ser o modelo de hipertensão animal que mais se assemelha com a hipertensão arterial essencial observada em humanos. Estudos laboratoriais têm demonstrado que as características hemodinâmicas desses animais são muito similares as encontradas na hipertensão essencial humana¹⁶. Os ratos SHR nascem com PA normal (112mmHg) e desenvolvem espontaneamente, sem causa aparente ou predeterminante, um aumento na PA a partir da 8ª semana após nascimento, podendo chegar a 200mmHg com 12 semanas de vida¹⁶.

Medida de pressão arterial

A medida de pressão arterial sistólica foi realizada pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos (Plethysmograph Physiograph[®] MK-III-S / NBS – Narco Bio-Systems / Houston, Texas, USA). Primeiramente os animais foram aquecidos por 10 minutos em estufa com temperatura controlada (40°C), possibilitando a observação da pulsação na artéria da cauda dos animais. A seguir os animais foram colocados em compartimento de acrílico, e então a pulsação foi detectada através de pletismógrafo e transdutor de pulso pneumático. A partir

de uma escala de calibração era possível se determinar o valor referente ao primeiro pulso captado. Este valor foi considerado como pressão arterial sistólica.

Os registros de pressão foram realizados em laboratório específico, onde o barulho era controlado e a luminosidade era a mesma do biotério, permitindo assim maior controle de estresse do animal. Os animais não foram anestesiados durante o procedimento, uma vez que a pletismografia de cauda não é um método invasivo.

Foram utilizados ratas Wistar que apresentaram PA por volta de 112 mmHg e ratas SHR com PA igual ou maior que 150 mmHg, no dia zero da prenhez. Usamos também ratos machos Wistar com pressão arterial normal (112 mmHg) e SHR com pressão arterial igual ou superior a 150 mmHg.

Grupos experimentais

Trabalhamos com 4 grupos de animais, ratos SHR com 30 dias de vida (filhotes) e com 3 meses (jovens). E os ratos normotesos Wistar com 30 dias e com 3 meses.

Coleta da saliva

Após jejum de 12 horas (uma noite), os ratos foram anestesiados com xilazina (25 mg/kg de peso corporal, com injeção intramuscular, Copazine[®], Coopers/10mL) e quetamina (45 mg/kg de peso corporal, intramuscular, Dopalen, Vetbrands/10mL). O fluxo salivar foi estimulado por nitrato de pilocarpina (Sigma) aplicado com injeção intraperitoneal, na dose de 5mg/kg de peso corporal. A coleta de saliva foi realizada de acordo com o método de Bernarde²⁸. Os animais foram colocados em prancha inclinada e a saliva total foi coletada em bequeres previamente pesados e mantidos em gelo, durante 15 minutos, contados a partir da primeira gota. O volume de saliva foi calculado pela diferença de peso do béquer cheio e vazio, considerando-se a densidade igual a 1 mg/ml. Posteriormente a saliva foi armazenada em freezer (-70°C) até o dia de realização dos experimentos para determinação da capacidade tamponante, determinação da concentração dos íons cálcio e fluoreto,

determinação da concentração de proteínas totais, atividade da amilase e dosagem de IgA salivar.

Determinação do fluxo salivar

O volume de saliva foi calculado pela diferença de pesos do béquer vazio e do béquer cheio, considerando a densidade da saliva igual a 1mg/ml. O fluxo salivar foi calculado considerando a quantidade de saliva coletada por minuto. Devido a diferença de peso entre os animais, o fluxo salivar foi normalizado com o peso do animal, e expressado em ml/min/100g.

Determinação do pH salivar

Imediatamente após a coleta de saliva, o pH foi determinado utilizando o volume total de saliva secretada, através de eletrodo específico de pH (Analyser) para pequenos volumes, acoplado ao pHmetro (Thermo Fischer, Orion 720A), previamente calibrado com soluções padrão de pH 6,86 e pH 4,01 (Quimis aparelhos científicos Ltda, Diadema, SP).

Determinação da capacidade tamponante da saliva

Amostras de saliva foram diluídas na concentração de 1:10 (20 μ L de saliva adicionados a 180 μ L de água deionizada). O pH inicial da solução foi determinado, o qual corresponderia ao pH da saliva para um volume zero de ácido láctico. A determinação da capacidade tamponante ou capacidade-tampão foi feita por titulometria, no entanto diferente da técnica padronizada por estudos anteriores, em nosso experimento não foi utilizado um indicador de titulometria como o alaranjado de metila. Com auxílio de micropipetas, volumes de 2 μ L de ácido láctico (0,1 mol/L), foram adicionados às amostras de saliva, até reduzir o pH salivar para o valor de 4,0. A cada adição de ácido láctico, a solução (saliva + ácido láctico) era agitada com auxílio de vórtex e a medida do pH era realizada. A capacidade tamponante foi expressa em volume de ácido láctico em mL necessário para levar o pH de 100 mL de saliva para o valor 4,0.

Determinação da concentração de íons Fluoreto (F⁻) na saliva

A determinação da concentração de fluoreto na saliva foi realizada com a saliva concentrada (não diluída), o volume de saliva utilizado para as leituras foi de 40µL, a este volume foi acrescido 40µL de solução ajustadora de pH, TISAB II (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA) e então a concentração foi determinada através de eletrodo íon específico 9409BN (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA) e microeletrodo de referência (Analyser), acoplado a um analisador de íons Orion 720 A (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA). O conjunto foi previamente calibrado com padrões de concentração de flúor de 0,150; 0,300; 0,600; 1,200 e 2,400 µg F/mL, obtidos por diluição seriada, também acrescido de solução ajustadora de pH, TISAB II (Orion Research Inc, Beverly, MA, USA). As leituras foram realizadas em mV e em duplicata, e posteriormente transformadas em µg F/mL.

Determinação da concentração de íons Cálcio (Ca²⁺) na saliva

Para a análise das concentrações de cálcio ionizado utilizamos 80µl de saliva de cada amostra, adicionando a esta 16µl do ajustador de força iônica para cálcio (ISA-932011-ORION), posteriormente a concentração de Ca²⁺ foi determinada utilizando-se eletrodo específico de cálcio (marca Orion, modelo 9320BN) junto ao microeletrodo de referência (Analyser) e analisador de íons (Orion 720 – A⁺), previamente calibrado. As análises foram expressas em mV e realizadas em duplicatas. A curva de calibração foi feita com cinco concentrações diferentes de cálcio (10; 20; 40; 80 e 160 µgCa/mL) obtidas partir da solução padrão de Ca²⁺ (mod. 922006A).

Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas nas alíquotas coletadas foi determinada pelo método de Lowry²⁹. Realizado com auxílio de espectrofotômetro e quatro soluções, que são: **A**) Na₂CO₃ a 2% em NaOH a 0,1M; **B**) CuSO₄·5H₂O a 0,5% e citrato de sódio a 1%; **C**) 50mL da solução **A** e 1mL da solução **B**; e **D**)

Reagente de Folin Ciocalteaux diluído em água deionizada. Como solução padrão utilizamos a albumina de soro bovino (BSA) 0,1% em NaOH 1%, a partir desta a curva de calibração foi estabelecida com oito concentrações diferentes de proteínas (5, 10, 20, 40, 50, 80, 100, 200µg). O volume de saliva, por amostra, utilizado nas leituras foi de 10µL, a este volume, primeiramente, foi adicionado 190µL de água deionizada e 3mL da solução **C**. Após 10 minutos adicionamos as amostras 300µL da solução **D**, agitamos e passados 30 minutos, as leituras de absorbância a 660nm foram realizadas e assim determinadas as concentrações de proteínas totais.

Atividade da amilase salivar

A atividade da amilase salivar foi mensurada por método cinético, através de leituras de absorbância a 405 nm, usando 2-cloro-p-nitrofenil- α -D-maltotriose (CNP-G3) como substrato (Kit Amilasa 405, Wiener lab, 2000-Rosário, Argentina). A amilase hidrolisa o substrato, liberando CNP (2-cloro-p-nitrofenol). O CNP absorve a 405nm e a velocidade de formação da cor é diretamente proporcional à atividade enzimática. Inicialmente 350µL de reagente foi colocado em well da “microplate” de 96 well e incubado por 4 minutos a temperatura de 28°C, após este tempo 15 µl de saliva diluída em soro fisiológico (1:10) foi adicionado ao reagente, agitamos e as leituras de absorbância foram feitas no tempos 1 minuto e 2 minutos. Determinamos a diferença entre a primeira e segunda leitura (ΔA), e a atividade da amilase foi determinada através do cálculo dos resultados com a formula: $\text{Amilase(U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1.628$, fornecida pelo fabricante.

Dosagem de IgA na saliva

Para a saliva, foi realizada a adaptação do método, seguindo a padronização utilizada para dosagem no sangue. A imunoglobulina A reage com o anticorpo específico (Anti-soro Anti-IgA, Wiener lab. 2000- Rosário, Argentina), formando imunocomplexos insolúveis, a turbidez formada por estes imunocomplexos é proporcional a concentração de IgA na amostra e pode ser lida com espectrofotômetro. A curva de calibração foi obtida através do

calibrador de proteínas (Wiener lab. 2000- Rosário, Argentina) diluído em solução fisiológica nas proporções 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640. A longitude de onda utilizada foi 340nm. A absorbância foi lida antes da adição do anti-soro (DO_1) e após adição e incubação de 30 minutos (DO_2) a aproximadamente 25°C, a partir do ΔA determinamos as concentrações de IgA em mg/dL. Para a dosagem de IgA utilizamos 50 μ L de saliva acrescidos de 900 μ L de tampão IgA, esta solução foi homogeneizada e a leitura de absorbância realizada, determinando então a DO_1 . Após esta leitura foi adicionado 80 μ L de anti-soro anti-IgA, passados 30 minutos nova leitura de absorbância foi feita (DO_2) e a concentração de IgA foi determinada pela diferença da primeira e da segunda leitura (ΔA).

Análise Estatística

Para cada parâmetro bioquímico de interesse foram coletadas amostras independentes de cada um dos grupos e calculadas medidas descritivas básicas como mediana, média, desvio-padrão e erro-padrão da média. Uma vez verificada a suposição de normalidade das populações, utilizamos testes estatísticos para verificar se havia diferença entre as médias dos grupos. Quando o parâmetro analisado possuía apenas dois grupos, foi escolhido o teste T; quando havia mais de dois grupos, foi escolhido o Teste de Multivariância ANOVA (One-Way ANOVA). Neste último caso, uma vez rejeitada a hipótese de igualdade das médias de todos os grupos, procedemos ao teste posterior de Tukey, para comparação múltipla das médias, a fim de identificar entre quais grupos as diferenças eram significativas.

Além do acima exposto, verificamos se a premissa de homogeneidade de variância entre os grupos, fundamental para a análise via ANOVA, fora violada, através da aplicação do teste de Bartlett. Havendo diferença significativa entre as variâncias, optamos por abandonar a ANOVA e utilizar o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a igualdade das medianas de todos os grupos. Sendo rejeitada a hipótese de igualdade das medianas de todos os grupos, realizamos o teste posterior de Dunn, para comparação múltipla das medianas, com o intuito de verificar entre quais grupos as diferenças eram significativas.

Para todos os testes estatísticos utilizamos o nível de significância de 0,05, afirmando que há diferença significativa entre as médias ou medianas para resultados de $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4. Resultados

Pressão Arterial

A aferição da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizada somente nos grupos de ratos jovens. O valor médio da PAS de ratos SHR ($161 \pm 3,78$ mmHg) foi 46% maior do que a PAS de ratos normotensos ($110 \pm 4,39$ mmHg), e tal diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$), conforme figura 01.

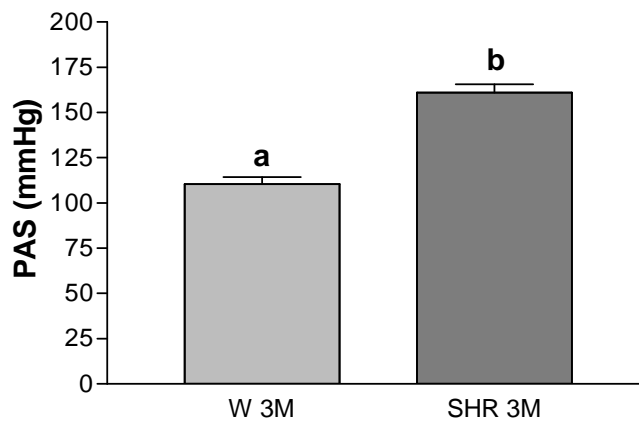


Figura 01: PAS de ratos jovens em mmHg ($n=9-11$). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (Teste t). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Peso

Os animais foram pesados em balança, imediatamente antes aos experimentos para a coleta da saliva. Observamos que nos grupos de ratos normotensos e também de ratos hipertensos o desenvolvimento foi associado ao ganho de peso dos animais. No grupo dos ratos Wistar (normotensos), os animais aos 3 meses ($353,2 \pm 9,33$ g) pesavam aproximadamente 4 vezes mais que os animais de 30 dias ($80,4 \pm 3,96$ g). Os ratos SHR, que aos 30 dias apresentaram peso igual a $45 \pm 4,07$ g, aos 3 meses possuíam peso médio, aproximadamente, 5 vezes superior ($235,4 \pm 4,52$ g). Quando a comparação entre os animais hipertensos e normotensos foi realizada observamos que, o

grupo dos animais hipertensos apresentou menor peso corporal independentemente da idade ($p < 0,001$).

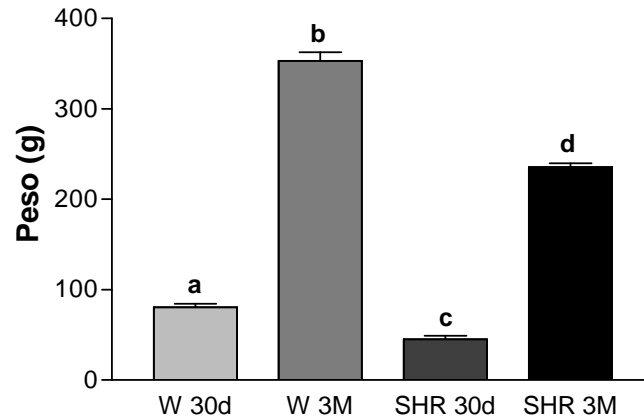


Figura 02: Peso dos ratos em gramas ($n=10$). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (ANOVA e teste posterior de Tukey). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fluxo Salivar

Após a anestesia, o fluxo salivar foi estimulado com pilocarpina (5mg/Kg) e a saliva foi coletada durante 15 minutos após a queda da primeira gota. Durante a realização dos experimentos, observamos que a estimulação com pilocarpina induziu a secreção salivar com padrão bastante alterado entre os grupos. Em alguns dos ratos SHR a dose de pilocarpina padronizada não foi suficiente para indução da salivação, estes não foram considerados em nossos resultados, uma vez que a coleta da saliva era necessária para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. O volume de saliva foi calculado pela diferença de peso entre os béqueres cheios e vazios. O fluxo salivar foi expresso em mL/min., considerando a densidade da saliva igual a 1 mg/mL.

A figura 03 mostra a mediana do volume de saliva secretada por minuto, de cada grupo. Através do gráfico pode-se observar que o desenvolvimento aumentou o volume de saliva secretada pelos ratos normotensos (30d: 0,025mL; 3M: 0,095mL) ($p < 0,01$), porém no grupo de ratos hipertensos (30d:

0,013mL; 3M: 0,033mL) o aumento da salivação gerado pelo desenvolvimento do animal não mostrou diferença estatística significativa ($p>0,05$). Ao levarmos em consideração o fator hipertensão, observa-se que somente entre o grupo de ratos de 3 meses este fator diminuiu de forma significativa a saliva secretada ($p<0,05$).

Tabela 01: Fluxo salivar de ratos Wistar e ratos SHR em mL/min.

	Média \pm EPM	Mediana
Wistar 30dias	0,024 \pm 0,002	0,025 ^b
Wistar 3meses	0,096 \pm 0,007	0,095 ^a
SHR 30dias	0,015 \pm 0,003	0.013 ^b
SHR 3meses	0,034 \pm 0.005	0,033 ^b

Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

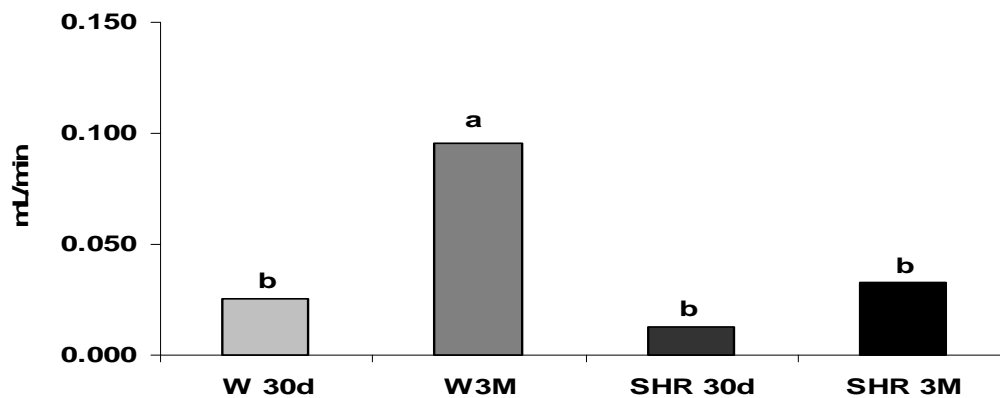


Figura 03: Fluxo salivar dos ratos em mL/min (n=8-12) As barras representam a mediana dos experimentos realizados (Kruskal Wallis e teste posterior de Dunn). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

Devido à diferença de peso entre grupos de animais, o fluxo salivar foi normalizado pelo peso dos animais, e expresso em mL/min por 100g de peso corporal (mL/min/100g). Tal normalização dos dados nos permitiu utilizar o teste para comparação das médias (ANOVA) entre os grupos, pois a premissa de igualdade das variâncias dos grupos não foi violada (teste de Bartlett).

Ao normalizarmos os valores do fluxo de acordo com o peso do animal, observamos (Figura 04) que há diferença significativa ($p < 0,01$) somente entre os grupos de ratos jovens, onde o fluxo salivar dos ratos SHR ($0,015 \pm 0,002$ mL/min/100g) foi aproximadamente 37,5% menor que o dos ratos Wistar ($0,025 \pm 0,001$ mL/min/100g). Entre os animais de 30 dias não foi observada diferença entre o fluxo salivar (SHR: $0,015 \pm 0,002$ mL/min/100g; W: $0,020 \pm 0,002$ mL/min/100g)

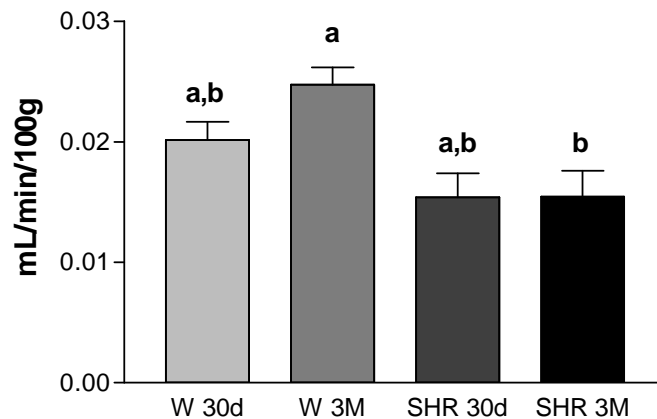


Figura 04: Fluxo salivar dos ratos em mL/min/100g (n=8-12). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (ANOVA e teste posterior de Tukey). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

pH

O pH salivar foi medido logo após a coleta, antes das amostras serem congeladas. O volume total de saliva coletado foi colocado em eppendorf e mantidos em gelo durante o procedimento de determinação do pH.

A tabela 02 e a figura 05 mostram as medianas dos valores de pH obtidos no experimento. A idade não alterou o pH no grupo de ratos normotensos e hipertensos de maneira significativa. Os ratos SHR de 3 meses apresentaram o pH salivar (8,28) aumentado em relação ao seu grupo controle, Wistar de 3 meses (8.06) ($p < 0.01$) Entre os ratos de 30 dias os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa (W:8,09 SHR: 8,33).

Tabela 02: pH da saliva de ratos Wistar e ratos SHR

	Média \pm EPM	Mediana
Wistar 30dia	8,1 \pm 0,07	8,06 ^{a,b}
Wistar 3meses	7,9 \pm 0,09	8,09 ^a
SHR 30dias	8,3 \pm 0,03	8,28 ^{a,b}
SHR 3meses	8,3 \pm 0.06	8,33 ^b

Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

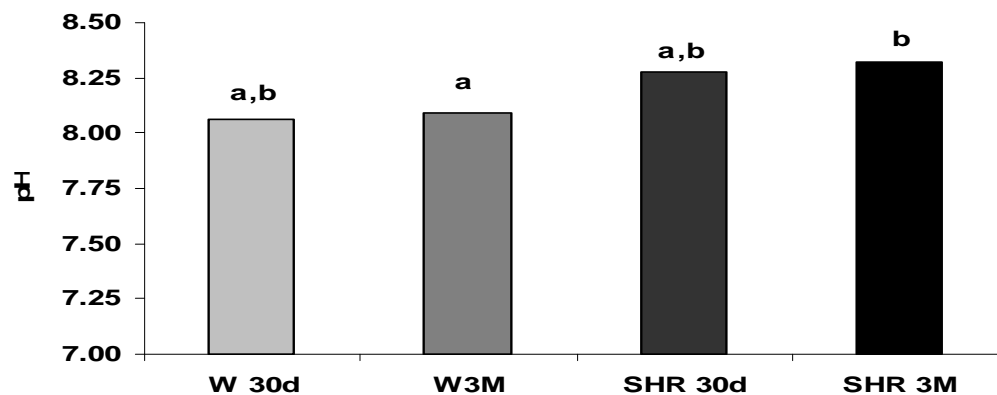


Figura 05: pH da saliva dos ratos (n=10-18). As barras representam a mediana dos experimentos realizados. (Kruskal Wallis e teste posterior de Dunn). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Capacidade Tamponante

No grupo de ratos normotensos os valores da capacidade tamponante não apresentaram diferença significativa entre as diferentes idades (30d: $47,7 \pm 3,6$; 3M: $51,07 \pm 5,2$ mL). Em filhotes de ratas hipertensas ($43,2 \pm 1,7$ mL) a saliva apresentou capacidade tamponante semelhante à de ratos normotensos, porém em SHR jovens ($35,9 \pm 2,2$ mL) foi observada uma redução desta capacidade tamponante ($p < 0,05$) (figura 06).

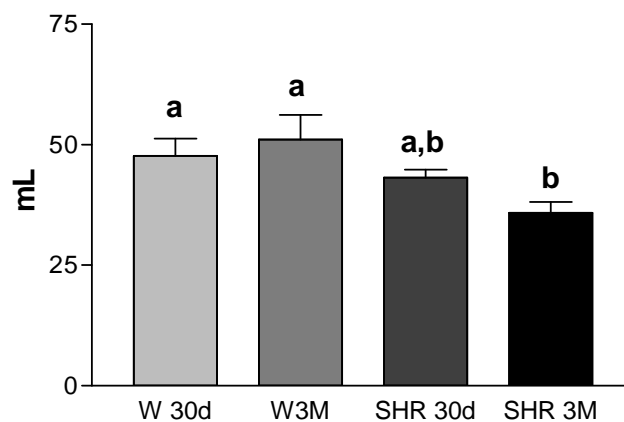


Figura 06: Capacidade tamponante da saliva de ratos, mL ácido láctico/100mL saliva (n=7-15). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (ANOVA e teste posterior de Tukey). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Concentração de Fluoreto

Para as dosagens de flúor salivar pipetou-se $40 \mu\text{L}$ da saliva total acrescido de $40 \mu\text{L}$ de TISAB II, as leituras foram realizadas em mV e em duplicata, sendo transformadas em $\mu\text{g F/mL}$. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 3% para todos os padrões, $r \geq 0,99$ (linearidade) e Slope entre -54 a -62 foram aceitas.

A tabela 03 e a figura 07, através dos valores das medianas, mostram que entre os ratos normotensos a idade aumentou bastante a concentração de fluoreto salivar (30d: 0,015; 3M: $0,045 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0,01$). No grupo dos ratos

hipertensos houve aumento desta concentração, devido ao desenvolvimento do animal, porém este aumento não mostrou diferença estatística significativa (30d: 0,010; 3M: 0,018 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Comparando os valores da concentração de fluoreto salivar entre os ratos de 3 meses observamos que a hipertensão reduziu significativamente este parâmetro ($p < 0,05$).

Tabela 03: Concentração de Fluoreto na saliva de ratos Wistar e ratos SHR

	Média \pm EPM	Mediana
Wistar 30dias	0,015 \pm 0,001	0,015 ^b
Wistar 3meses	0,053 \pm 0,007	0,045 ^a
SHR 30dias	0,011 \pm 0,001	0,010 ^b
SHR 3meses	0,022 \pm 0.005	0,018 ^b

Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

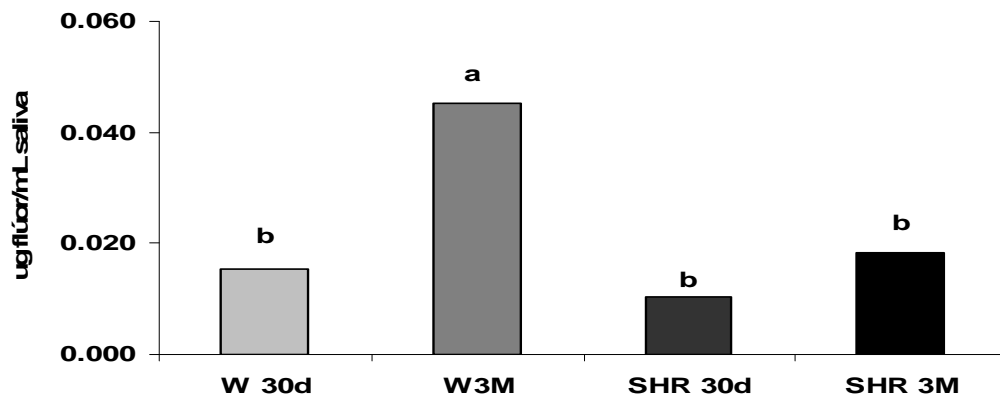


Figura 07: Concentração de fluoreto na saliva de ratos, $\mu\text{gF}/\text{mL}$ ($n=10$). As barras representam a mediana dos experimentos realizados. (Kruskal Wallis e teste posterior de Dunn). Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Concentração de Íons Cálcio

Os resultados da concentração de cálcio ionizado nas amostras de saliva foram reunidos e expressos em $\mu\text{g/mL}$. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 3% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ foram aceitas. A taxa de reprodutibilidade aceita entre as duplicatas das amostras foi acima de 90%.

Assim como a concentração de fluoreto, os valores obtidos pela dosagem de íons cálcio na saliva mostram que os ratos hipertensos possuem menor concentração deste íon (30d:3,66; 3M: 5,13 $\mu\text{g/mL}$) e, diferente dos normotensos, a idade não alterou este padrão. No grupo de ratos normotensos o desenvolvimento aumentou significativamente a concentração de cálcio livre salivar (30d: 4,01; 3M: 24,84 $\mu\text{g/mL}$) ($p < 0,01$). A comparação feita entre os ratos aos 3 meses mostra diferença significativa entre os grupos, onde os ratos hipertensos apresentaram menor concentração de íons cálcio do que os ratos normotensos ($p < 0,01$), tabela 04 e figura 08.

Tabela 04: Concentração de Íons Cálcio na saliva de ratos Wistar e ratos SHR.

	Média \pm EPM	Mediana
Wistar 30dias	4,9 \pm 0,6	4,09 ^b
Wistar 3meses	30,9 \pm 4,9	24,84 ^a
SHR 30dias	3,8 \pm 0,46	3,66 ^b
SHR 3meses	4,9 \pm 0.42	5,13 ^b

Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

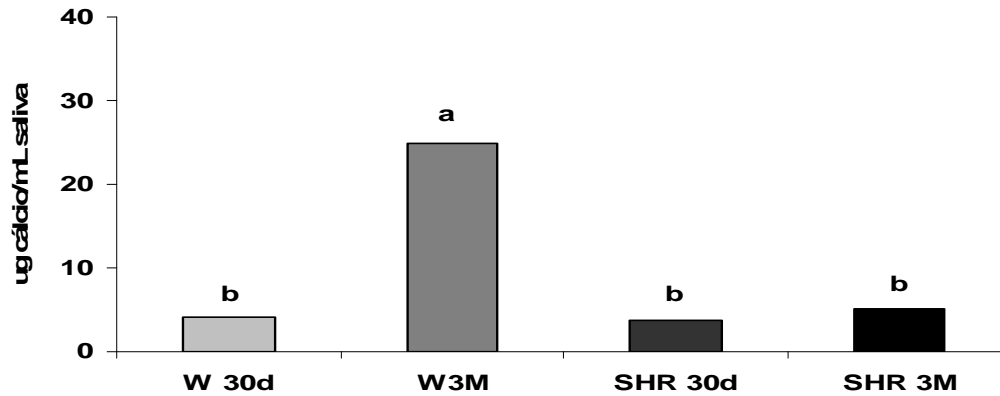


Figura 08: Concentração de íons cálcio na saliva de ratos, $\mu\text{gCa/mL}$ ($n=10-11$). As barras representam a mediana dos experimentos realizados. Letras diferentes representam diferença estatística significativa (Kruskal Wallis e teste posterior de Dunn, $p<0,05$).

Concentração de Proteínas Totais

Ao analisarmos os valores das concentrações de proteínas, observamos (figura 09) que no grupo dos ratos SHR (30d: $0,80\pm 0,16$; 3M: $1,66\pm 0,21\mu\text{g/mL}$) a idade gerou aumento de aproximadamente 100% desta concentração ($p<0,01$). O que não foi observado nos ratos normotensos (30d: $1,06\pm 0,16$; 3M: $1,33\pm 0,16\mu\text{g/mL}$), onde o desenvolvimento não alterou significativamente este parâmetro, já os SHR apresentam diferença entre eles, sugerindo que o rato hipertenso nasce com deficiência de proteínas salivares e esta é recuperada com o desenvolvimento do animal. A comparação feita entre os animais de mesma idade não mostrou diferenças estatisticamente significativas

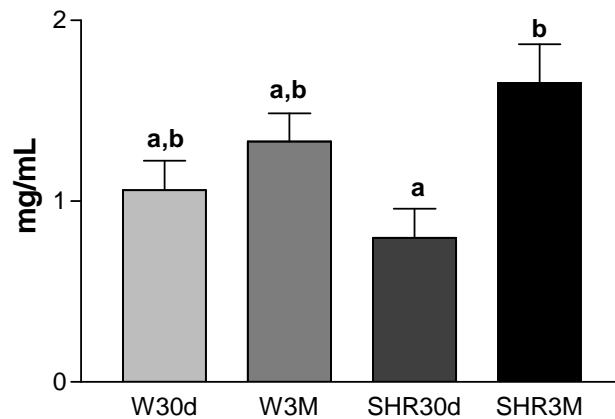


Figura 09: Concentração de proteínas totais na saliva de ratos, mg/mL (n =10-11). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados (ANOVA e teste posterior de Tukey). Letras diferentes representam diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Atividade da Amilase Salivar

A atividade de amilase salivar em ratos normotensos foi aumentada com a idade, os filhotes apresentaram como valor médio de concentração $0,33 \pm 0,058$ U/mL e os ratos normotensos jovens $0,74 \pm 0,052$ U/mL, mostrando então um aumento de aproximadamente 120%. Entre os animais hipertensos a idade não alterou a atividade da amilase (30d: $0,49 \pm 0,082$; 3M: $0,58 \pm 0,083$ U/mL), sugerindo que a hipertensão impede o aumento da atividade da amilase durante o desenvolvimento do animal (Figura 10).

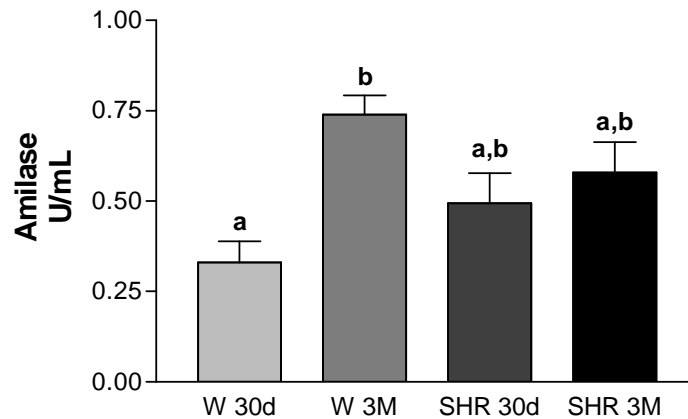


Figura 10: Atividade da amilase na saliva de ratos, U/mL (n=09-10). As barras representam a média \pm EPM dos experimentos realizados. ($p < 0,05$, ANOVA). Letras diferentes representam diferença estatística significativa.

Quando comparamos os valores da concentração de proteínas totais e a atividade da amilase salivar, notamos que o aumento de proteínas, gerado pelo desenvolvimento do animal, observado nos ratos hipertensos de 3 meses não foi ocasionado pelo aumento da proteína amilase, que entre os SHR não foi diferente. Já no grupo de animais normotensos apesar de não ter ocorrido diferença na concentração de proteínas totais, há um aumento, gerado pelo desenvolvimento, da atividade da amilase salivar.

Concentração de IgA na saliva

Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de IgA na saliva dos diferentes grupos analisados.(tabela5 e figura 11).

Apesar da diferença não ter sido significativa, através da figura 11 notamos que há um aumento da concentração de IgA no grupo do ratos SHR de 30 dias, talvez este aumento de anticorpo seja uma defesa do organismo com a finalidade de compensar a deficiência nutricional observada neste grupo.

Tabela 05: Concentração de IGA na saliva de ratos Wistar e ratos SHR

	Média \pm EPM	Mediana
Wistar 30dias	57,1 \pm 12,0	46,0 ^a
Wistar 3meses	66,9 \pm 9,3	74,9 ^a
SHR 30dias	83,7 \pm 13,0	96,0 ^a
SHR 3meses	63,3 \pm 10,8	59,6 ^a

Letras diferentes representam diferença estatística significativa

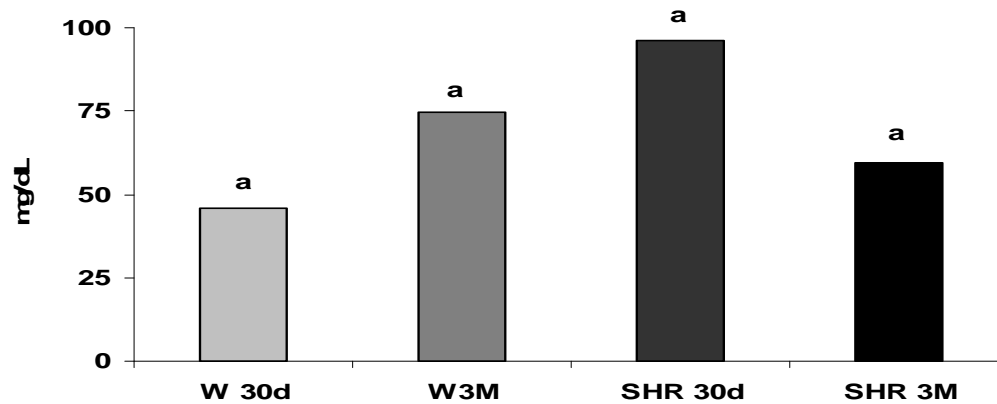


Figura 11: Concentração de IgA na saliva de ratos, mg/dL (n=3). As barras representam a mediana dos experimentos realizados. Letras diferentes representam diferença estatística significativa (Kruskal Wallis e teste posterior de Dunn, $p < 0,05$).

5. Discussão

5. Discussão

O rato espontaneamente hipertenso apresenta alteração de desenvolvimento.

Nossos resultados demonstraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam menor peso corporal quando comparados aos seus respectivos controles normotensos Wistar independentemente da idade (30d e 3M) que apresentam. Estes resultados corroboram os obtidos em um estudo anterior²¹, onde observamos que ratas SHR apresentaram um menor ganho de peso durante a prenhez, reduzido tamanho da ninhada e animais com menor peso aos 30 dias de vida. Outros autores¹⁹ também observaram que ratas SHR ganhavam menor peso durante a prenhez que ratas Wistar-Kyoto (WKY) e como o peso da placenta não era alterado, este menor ganho de peso foi atribuído a um menor peso fetal de SHR em relação aos controles normotensos^{19,30,31,32}.

A redução no desenvolvimento de SHR poderia estar diretamente associada ao genótipo destes animais, no entanto, evidências levantam a hipótese de que ambos os períodos pré e pós-natais, relativos ao contato direto com a fêmea SHR, teriam importância além da susceptibilidade genética do feto. Transferências embrionárias realizadas entre SHR e WKY demonstraram que o peso ao nascimento de fetos SHR que se desenvolveram em úteros de fêmeas WKY foi maior do que daqueles desenvolvidos em fêmeas SHR, e que o peso ao nascimento de fetos WKY não foi alterado pela gestação em fêmeas SHR³³. Estes dados sugeriram que fatores maternos e a predisposição fetal são requeridos para que ocorra o baixo desenvolvimento em SHR. Estudos realizados com criação cruzada ("cross foster") demonstraram que filhotes SHR amamentados por mães WKY tiveram aumento de peso e apresentaram maiores pesos corporais durante o período analisado do que filhotes SHR amamentados por mães SHR, ou daqueles desenvolvidos em útero de fêmeas WKY mas amamentados por fêmeas SHR, e que os filhotes WKY que foram amamentados por fêmeas SHR tiveram redução de peso corporal durante o período pós-natal avaliado^{33,34,35}. Fatores maternos agindo no útero ou através do leite, teriam impacto importante no desenvolvimento pré e pós-natal de filhotes SHR. Estes fatores parecem estar essencialmente correlacionados com

a nutrição dos fetos ou dos recém-nascidos. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são modelos experimentais que independentemente de intervenções nutricionais, cirúrgicas ou endócrinas apresentam restrição de crescimento intra-uterino^{19,20}. Restrição de crescimento intra-uterino resulta, em parte, em deficiências nutricionais incluindo redução de transporte de oxigênio e de nutrientes através da placenta e redução de fluxo sanguíneo feto-placental. Deficiências em importantes fatores relacionados ao crescimento fetal, têm sido observada nos fluídos amniótico e placentários assim como no plasma fetal de SHR^{19,32}. Alteração na atividade da glândula mamária, com produção de menor quantidade e qualidade de leite, também foi evidenciada em fêmeas SHR³⁶. Como o leite é usualmente a única fonte de nutrição para o neonato durante o período de amamentação, a redução do crescimento pós-natal de filhotes SHR foi diretamente associada a estas alterações. Deficiências nutricionais, pré-natal assim como a pós-natal, têm sido fortemente e consistentemente associadas ao desenvolvimento e crescimento alterado do indivíduo, assim como a predisposição para o desenvolvimento de doenças que se manifestam na vida adulta. Para os filhotes SHR, foi demonstrado que ambos os períodos de desenvolvimento no útero e de amamentação contribuem para o início do desenvolvimento do processo hipertensivo que se manifestará como hipertensão na maturidade³³. Verificamos que nossos resultados reforçam esta observação quando demonstramos que SHR aos 3 meses, com pressão arterial acima de 150mmHg, apresentaram redução significativa de peso se comparados aos ratos normotensos Wistar.

Em nosso estudo, não tivemos como objetivo avaliar possíveis alterações nutricionais, porém todas as considerações feitas são pertinentes para o entendimento dos fatores associados ao menor desenvolvimento do modelo animal utilizado que foi avaliado aos trinta dias, idade pré-hipertensiva e aos 3 meses, onde valores de pressão considerados aumentados já tinham sido atingidos.

Ratos espontaneamente hipertensos apresentam redução de fluxo salivar

Ao compararmos o fluxo salivar entre os grupos de ratos Wistar, observamos um aumento significativo do fluxo associado ao aumento da idade, 30 dias e 3 meses. Esta observação está em acordo com outros estudos

experimentais e clínicos que demonstraram que o fluxo salivar aumenta com o desenvolvimento do animal/indivíduo. Clinicamente, foi demonstrado que o fluxo salivar aumenta progressivamente da infância para adolescência³⁷. No entanto, este aumento não foi observado entre os ratos hipertensos. O fluxo salivar de SHR aos 30 dias não é diferente do observado em SHR aos 3 meses. Aos 3 meses, ratos SHR apresentam valores de fluxo salivar menores que os ratos normotensos de mesma idade. Outros autores também observaram redução de fluxo estimulado por pilocarpina em SHR de 22 semanas e redução do fluxo estimulado por isoproterenol em ratos SHR de 16-18 semanas, sugerindo que, independente do tipo de estimulação (muscarínica ou adrenérgica), o fluxo salivar em ratos espontaneamente hipertensos está reduzido^{26,27}.

Vários fatores poderiam estar envolvidos na alteração da secreção salivar observada em SHR. Como em nosso estudo avaliamos o fluxo salivar em dois períodos distintos do desenvolvimento do animal experimental, discutiremos inicialmente a possível correlação entre ambas as observações.

Estudos clínicos e experimentais têm associado o menor desenvolvimento pré ou pós-natal, conseqüente de má-nutrição ou de fatores correspondentes, à redução da atividade salivar¹⁸. Crianças com má nutrição (pós-natal) apresentam fluxo salivar estimulado reduzido³⁸. Ratos Sprague-Dawley com 19 dias de vida, tratados com dieta deficiente em proteínas, apresentaram redução do peso corporal e de fluxo salivar³⁹. A privação de ferro na dieta também diminui o fluxo salivar em ratos de 21 dias, sugerindo que a falta de ferro neste período de crescimento e desenvolvimento causa alteração da atividade das glândulas salivares⁴⁰.

Em estudo anterior, havíamos observado²¹ que SHR aos 30 dias já apresentavam fluxo salivar estimulado por pilocarpina reduzido em comparação com ratos Wistar de mesma idade. Não encontramos na literatura estudos que descrevessem a atividade salivar em SHR nesta idade. Como os valores de fluxo salivar em função do peso do animal não foram diferentes entre os SHR de 30 dias e de 3 meses, os dados sugerem que esta alteração foi mantida mesmo com o desenvolvimento do animal. Como SHR são modelos de restrição nutricional intrauterina e pós-natal, nossos resultados reforçam a associação entre má-nutrição e redução de fluxo salivar.

Outros fatores poderiam também ser associados à redução do fluxo salivar observada em SHR. Como o reduzido fluxo salivar foi observado em ratos aos 30 dias, poderíamos sugerir que a menor atividade das glândulas salivares seria conseqüente do período analisado, ou seja, imediatamente após o desmame, onde a função salivar, devido à amamentação, não estaria fisiologicamente desenvolvida. Considerando esta hipótese, necessariamente deveríamos esperar estabelecimento da função salivar com o desenvolvimento do animal, como foi observado em ratos Wistar aos 3 meses, nos quais o fluxo salivar estava bastante aumentado se comparado ao de Wistar aos 30 dias. Porém, não observamos este aumento em SHR. Sugerindo que nestes animais existe uma alteração de função das glândulas salivares.

Aos 3 meses, com o estabelecimento dos altos valores de pressão arterial sistólica, a hipertensão também poderia ser considerada como fator determinante para a redução da secreção salivar. Menor secreção salivar e alterações na composição da saliva são freqüentemente observadas em indivíduos com hipertensão¹⁷. Porém, também são observadas em outras patologias sistêmicas como diabetes mellitus tipo-1, não dependente de insulina⁴¹ e a Síndrome de Sjogren (doença autoimune em que glândulas salivar e lacrimal tornam-se parcialmente ou totalmente não funcionais). As glândulas salivares são sensíveis a mudanças fisiológicas/patológicas, como o desequilíbrio hormonal, e a diferentes tratamentos farmacológicos. A interrupção do tratamento com anti-hipertensivos (β -bloqueadores) como o metoprolol em pacientes hipertensos leva ao aumento da atividade cardíaca e do fluxo sanguíneo regional, facilitando conseqüentemente um índice de fluxo salivar aumentado, ocorrendo efeito contrário quando o tratamento com β -bloqueador é reintroduzido⁴². Redução de 75% no fluxo salivar e alterações na quantidade de proteínas salivares foram observadas em ratos Sprague-Dawley (10-12 dias) tratados com dexametasona⁴³. Crianças asmáticas, tratadas com agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos (salbutamol e terbutalina) apresentam também redução do fluxo salivar além de alteração na qualidade da saliva⁴⁴.

Ao considerarmos todo o mecanismo de transdução de sinal iniciado com a pilocarpina, várias seriam as possibilidades de alterações correlacionadas com a redução da secreção salivar observada em SHR, desde alterações envolvidas com o acoplamento entre a droga e o receptor até a

mobilização de segundos mensageiros envolvidos nesta resposta farmacológica. A secreção salivar iniciada pela ligação da pilocarpina ao receptor muscarínico (M3) na superfície de células acinares, ativa proteínas G e fosfolipase C, levando a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), um componente da membrana plasmática, a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ hidrossolúvel ao se ligar a receptores IP₃ específicos no retículo endoplasmático destas células libera cálcio (Ca⁺²) deste estoque de Ca⁺² intracelular promovendo contração da célula acinar e secreção salivar². Ausência ou deficiência de receptores muscarínicos específicos, menor formação de segundos mensageiros (IP₃ e DAG) e mobilização de concentrações alteradas de cálcio intracelular, poderiam ser fatores determinantes para o reduzido fluxo salivar. Como ratos SHR apresentam baixa concentração de cálcio plasmático⁴⁵, os estoques de cálcio das células acinares poderiam apresentar baixas concentrações, o que iria promover menor contração celular e menor secreção de saliva fluida. No entanto, como em nosso estudo não realizamos ainda experimentos para avaliarmos estas possíveis alterações, nos faltarão dados para discorrermos sobre as possibilidades levantadas.

A qualidade da saliva de SHR está alterada

O fluxo é o parâmetro clínico mais importante da saliva afetando a susceptibilidade às lesões de cárie. A supressão, ou mesmo diminuição do fluxo salivar determina maior susceptibilidade à cárie dental, uma vez que a saliva é o líquido que lubrifica a mucosa bucal e exerce um papel relevante de defesa. O índice de fluxo salivar e os volumes de saliva na boca antes e após a deglutição são variáveis importantes para o índice de limpeza da cavidade oral feita pela saliva. Um alto índice de fluxo salivar resultará em limpeza mais rápida comparada à limpeza lenta nos baixos índices de fluxo salivar. Após sialodectomia, ratos alimentados com dieta cariogênica, apresentaram maior número de cáries (28,8/animal) do que os ratos controles nas mesmas condições (6,7/animal)⁴⁶.

A redução do fluxo salivar poderia estar diretamente correlacionada com menor atividade/hipofunção salivar. No entanto, a hipofunção salivar tem sido

caracterizada, além do fluxo diminuído, pela alteração na capacidade tamponante (tampão) e nos constituintes orgânicos e inorgânicos da saliva.

Para avaliar a capacidade tamponante da saliva, avalia-se primeiramente o valor de pH. A concentração de íons hidrogênio na saliva é expressa em unidades de pH, que são definidas como o logarítmo negativo da concentração de hidrogênio. Os íons hidrogênio na saliva vêm de diversas fontes. São secretados pelas glândulas na forma de ácidos inorgânicos e orgânicos, produzidos pela microbiota oral, ou absorvidos pela mucosa oral de bebidas ácidas ou de alimentos.

Observamos que aos 30 dias, os ratos SHR e Wistar secretam saliva com valores de pH e capacidade tamponante semelhantes. Porém, aos 3 meses, os ratos hipertensos apresentaram alterações significativas na capacidade tamponante da saliva se comparados aos ratos normotensos. Com o desenvolvimento dos animais, não foram observadas grandes variações no pH salivar, já que dentro do grupo de ratos normotensos ou de ratos hipertensos não foram observadas diferenças entre estes valores nas idades estudadas. Porém, ao avaliarmos os resultados referentes à capacidade tamponante, e compararmos (teste T de Student's) apenas os resultados obtidos entre SHR de 30 dias e de 3 meses, verificamos que houve uma redução significativa da capacidade tamponante associada ao desenvolvimento dos SHR. Pela primeira vez esta alteração foi demonstrada.

Sendo a capacidade tamponante a propriedade da saliva em manter o pH constante, isto é entre 6,9 e 7, nossos dados sugerem que SHR aos 3 meses, sofreriam maiores alterações de pH a partir de um desequilíbrio ácido-base do que ratos Wistar. Prejuízos importantes à higiene dental são esperados a partir da redução do pH, uma vez que a solubilidade dos fosfatos de cálcio aumenta a medida que o pH diminui e a solubilidade do esmalte aumenta mais ou menos 100 vezes a medida que este pH é reduzido de 7 para 5⁷.

A capacidade tampão se dá pela atividade de tampões ortofosfato inorgânico e do sistema ácido carbônico/bicarbonato. Sob condições de estimulação, o sistema-tampão bicarbonato corresponde a 90% da capacidade tampão salivar, todavia, na saliva não estimulada, a concentração de fosfato é semelhante à concentração de bicarbonato, e assim contribuem na mesma

extensão para capacidade tamponante² e manutenção da higidez da mucosa oral e dos dentes. Um aumento no valor de pH da saliva, correlacionado diretamente com maior produção de carbonato e com menor concentração de fosfatos, não levaria a prejuízos tão importantes quanto a sua redução. A concentração de bicarbonato na saliva depende do fluxo salivar⁴⁷. Com a redução do fluxo salivar, haveria conseqüentemente uma redução da concentração de bicarbonato e redução da capacidade tampão da saliva. Assim, a menor capacidade tamponante de SHR aos 3 meses, estaria correlacionada ao menor fluxo salivar.

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem afirmar que a qualidade da saliva de SHR está alterada uma vez que ela apresenta menor capacidade tamponante. Porém, estudos adequados deverão ser posteriormente realizados a fim avaliarmos a concentração de bicarbonato na saliva destes animais e a atividade de trocas iônicas, presentes nas células acinares das glândulas salivares, que envolvem o bicarbonato^{48,49}.

A concentração de flúor está reduzida na saliva de SHR

A presença de fluoreto na saliva é decisiva para a estabilidade mineral do dente. A presença destes íons reduz a perda mineral durante uma queda do pH, uma vez que diminuem a solubilidade da hidroxiapatita dental, tornando-a mais resistente a desmineralização³. A habilidade da saliva de levar constantemente fluoreto para a superfície do dente torna o fluoreto salivar um importante elemento na proteção contra cáries, promovendo a remineralização e reduzindo a desmineralização⁵⁰.

A presença de flúor na saliva depende da absorção a partir de fontes exógenas. Nos primeiros minutos após a ingestão, a concentração plasmática de fluoreto aumenta e o pico de concentração máxima é atingido após 20-60 min. A concentração plasmática máxima de flúor dependerá da quantidade ingerida, da razão de absorção, do volume de distribuição e da razão do "clearance" renal e esquelético. No plasma, o fluoreto não se liga a proteínas ou aos constituintes plasmáticos. Tanto o "clearance" renal e esquelético, quanto à redução da concentração absorvida, levam a redução rápida da concentração plasmática. Assim, o metabolismo do fluoreto ingerido é

caracterizado pela rápida absorção seguida por rápida captação pelos tecidos calcificados e alta taxa de excreção urinária⁵¹.

Em geral, os valores numéricos da concentração de fluoreto plasmático em adultos saudáveis, para os quais a principal fonte de flúor é a dieta, deveriam ser próximos aos observados na água de beber. Para um indivíduo que ingerisse água com 1 ppm (mg/mL) de fluoreto, como única fonte de fluoreto na dieta, a concentração plasmática seria próxima de 1,0 $\mu\text{mol/L}$ (*apud*⁹). Em ratos Wistar, a concentração de fluoreto no plasma, e também nos ossos, mostrou-se proporcional à concentração deste íon na água oferecida aos animais como única fonte exógena de flúor⁵². Em estudo recente foi demonstrado que a concentração de flúor encontrada no plasma e nos ossos de ratos Wistar de 90 dias é proporcional a quantidade de flúor presente na dieta, água mais ração⁵³. Para uma ingestão de 2,26 mg/Kg de peso/dia, foi encontrado no plasma uma concentração igual a 0,037 $\mu\text{g/mL}$.

A saliva vem sendo considerada como fluido diagnóstico para diferentes substâncias, uma vez que concentração de medicamentos e outras substâncias têm sido detectadas na saliva em quantidades equivalentes as concentrações plasmáticas⁵⁴. O flúor plasmático transpõe a membrana celular dos tecidos glandulares. A concentração do flúor nos ductos salivares segue os valores plasmáticos, embora podendo ser em níveis de 20 a 40% mais baixos. O fluido gengival, com concentração pouco acima do plasma (10%), contribui para a concentração final de flúor salivar, pelo menos no microambiente próximo a gengiva. Outra fonte bastante importante de fluoreto na saliva seria a quantidade que pode ser absorvida de substâncias fluoretadas pela vascularização de tecidos da cavidade oral. Esta absorção local resultará no aumento da concentração de flúor na saliva integral².

Nossos resultados demonstraram que a concentração de fluoreto quantificada na saliva de ratos Wistar aos 30 dias foi significativamente menor que a quantificada na saliva de ratos Wistar aos 3 meses.

Considerando que os filhotes permaneceram juntos com suas mães até o 30º dia pós-nascimento e que, muito provavelmente, sua única fonte de alimentação tenha sido o leite materno, a baixa concentração de fluoreto medida na saliva destes animais seria diretamente proporcional à concentração de flúor presente no leite, ou a baixa transferência a partir do leite materno

ingerido durante o período de lactação/amamentação. No leite, um fluido com pH mais básico que o plasma, o equilíbrio químico da molécula (HF), um ácido fraco com pKa de 3,4, é deslocado para ionização (F^-), limitando desta forma sua movimentação através das membranas (molécula ionizada, menos lipossolúvel). O metabolismo do flúor é pH dependente e sua transposição pelas membranas, na forma de HF, pode ser alterada em resposta às diferenças de acidez dos compartimentos corporais fluídos. No leite de mulheres, éguas e vacas foram encontradas concentrações de fluoreto que correspondem a 50% ou menos que a concentração plasmática ^{50, (apud 9)}. Assim, sugerimos que a reduzida concentração de fluoreto observada na saliva dos ratos de 30 dias deve ser proporcional a pequena concentração de flúor presente no leite ingerido por estes animais. Como no leite a concentração de flúor seria bastante reduzida, possível diferença na concentração de flúor na saliva de ambos os grupos poderiam não ter sido detectadas.

Com a separação das mães, após os 30 dias, a dieta dos ratos utilizados neste estudo passou a ser água potável e ração padrão *ad libitum*. Ao analisarmos a água, verificamos que a concentração de flúor foi de 0,068ppm (mgF/L) (valor médio de amostras coletadas), abaixo do que seria encontrado na água de abastecimento público (1 ppm), uma vez que a água do Campus da FOA-UNESP utilizada para o tratamento dos animais é proveniente de um poço artesiano. Na ração, utilizada também para o tratamento de ratos, verificamos que a concentração de flúor é de 18,21 mgF/Kg ração (valor médio de amostras analisadas). Avaliando a quantidade de água e ração ingerida por rato ao dia, em função do peso dos animais aos 3 meses, verificamos que ratos Wistar ingerem 1,56 mgF/Kg peso/dia e SHR ingerem 1,57 mgF/Kg peso/dia. Estes cálculos nos revelaram que a quantidade ingerida de flúor ao dia não é diferente entre os grupos. Na saliva de ratos Wistar aos 3 meses, verificamos um aumento significativo da concentração de flúor se comparada a saliva dos ratos aos 30 dias. Estes dados reforçam a sugestão de que a concentração de flúor encontrado na saliva é proporcional a concentração de flúor na alimentação. No entanto esta sugestão não poderia ser diretamente aplicada aos ratos hipertensos.

Pelos nossos resultados, verificamos que a concentração de flúor na saliva de SHR aos 3 meses estava significativamente reduzida em comparação

com a saliva de Wistar de mesma idade. Os Wistar e SHR receberam dieta contendo mesma quantidade de fluoreto (1,56-1,57 mgF/Kg de peso/dia), mas apresentaram a concentração de flúor na saliva igual a $0,053 \pm 0,007 \mu\text{gF/mL}$ e $0,022 \pm 0,005 \mu\text{gF/mL}$, respectivamente. Ou seja, na saliva de ratos Wistar a concentração de fluoreto foi 2,4 vezes maior que a presente na saliva de ratos SHR. Considerando que a quantidade de flúor proveniente da alimentação não difere entre os grupos, estes dados sugerem possíveis alterações nas etapas farmacocinéticas deste íon em SHR.

Vários fatores, como presença de cálcio, assim como outros cátions bi ou trivalentes, na dieta podem reagir com o flúor tornando compostos insolúveis e pobremente absorvíveis. Dessa maneira, a dieta rica em cálcio ou magnésio está associada com uma menor absorção de flúor. No entanto, em nosso estudo todos os animais receberam a mesma ração e água. Algumas drogas, doenças metabólicas ou respiratórias e a idade podem alterar também a absorção de flúor, sua remoção do plasma por deposição em tecidos ósseos e dentais e a excreção renal alterando a susceptibilidade de alguns indivíduos aos efeitos benéficos ou adversos do flúor^{55,56,57}.

Até o momento, os resultados obtidos neste estudo nos permitem sugerir que os mecanismos envolvidos na absorção, distribuição e excreção de flúor diferem entre os animais e que provavelmente estariam alterados em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Experimentos mais específicos serão conduzidos para avaliarmos os mecanismos envolvidos nestas possíveis alterações.

A concentração de cálcio está reduzida na saliva de SHR

O cálcio salivar é proveniente de duas fontes de origem, grânulos do zimogênio, que libera os dois tipos de cálcio, livre (iônico) e ligado a proteínas, e o fluido extracelular do qual o cálcio é transportado pelas células acinares e/ou ductos de epitélio para a saliva. A concentração de cálcio presente na saliva é diretamente proporcional a concentração plasmática⁵⁸.

O cálcio participa do equilíbrio entre os fosfatos de cálcio do tecido dental e a saliva adjacente². A saliva é geralmente supersaturada em respeito aos sais cálcio e fosfato, como a hidroxiapatita, e estes íons inibem a desmineralização e promovem a remineralização dental. Aumentando o fluxo

salivar, aumenta o grau de saturação destes sais, devido principalmente ao aumento do pH, podendo também aumentar a remineralização e diminuir a desmineralização⁵⁹.

O cálcio salivar é distribuído como cálcio iônico e cálcio ligado, dependendo do pH da saliva. O cálcio iônico é especialmente importante para os desafios cariogênicos e corresponde a cerca de 50% da concentração do cálcio total. O cálcio não-iônico liga-se a íons inorgânicos e orgânicos, apresenta uma forte ligação com a amilase, onde atua como um cofator necessário para a função desta enzima que corresponde a 40-50% do total de proteínas produzidas pelas glândulas salivares².

A concentração de cálcio na saliva não é afetada pela dieta alimentar, todavia doenças como a hipertensão e fibrose cística podem alterar os níveis de cálcio. A concentração de cálcio também pode ser influenciada por algumas drogas, como o verapamil, um bloqueador de canais de cálcio utilizado para tratamento de algumas doenças cardíacas, e a pilocarpina², agonista muscarínico que estimula o fluxo salivar.

Foi sugerido que a concentração de cálcio encontrada na saliva humana (1-3 mM) depende do fluxo salivar². O índice de fluxo salivar, alto ou reduzido, influenciaria a distribuição de cálcio nas frações livres e ligadas. Conforme já mencionado, o pH da saliva dependente do índice de fluxo salivar, assim como as concentrações da maioria das substâncias associadas ao cálcio. Em casos de baixo fluxo, a concentração de bicarbonato seria muito reduzida e conseqüentemente, a concentração do complexo cálcio-bicarbonato também seria baixa. Porém, resultados contraditórios também têm sido apresentados, uma vez que alguns autores⁶⁰ afirmam que concentração de íons cálcio na saliva de humanos seria diretamente dependente do fluxo salivar e outros⁶¹ demonstram que mesmo com um aumento do fluxo salivar de 0,1 mL/min para 2mL/min a concentração de cálcio diminui em 5%.

Em nossos experimentos observamos que a concentração de cálcio iônico salivar aumentou com o aumento do fluxo salivar ou com o desenvolvimento dos ratos normotensos. Em um estudo realizado com ratos Sprague-Dawley, normotensos, a concentração de cálcio salivar total encontrada não foi relacionada com o volume de saliva secretado ou com a concentração da proteína amilase⁵⁸. Em ratos Sprague-Dawley, também foi

observada uma correlação entre concentrações de proteínas totais e cálcio salivar⁶².

No entanto, em ratos SHR não observamos a correlação direta entre aumento de idade e aumento na concentração de cálcio iônico salivar. Na saliva de SHR, a mesma concentração de cálcio foi observada aos 30 dias e aos 3 meses, sendo que esta concentração estava bastante reduzida em relação ao grupo controle.

A reduzida concentração de cálcio na saliva de SHR aos 3 meses poderia estar diretamente associada ao reduzido fluxo salivar observado em SHR. Porém, foi descrito que a concentração plasmática de cálcio livre no plasma de ratos SHR seria reduzida em comparação com seus controles normotensos⁴⁵, razão para uma distribuição de menores quantidades de cálcio para as glândulas salivares e conseqüentemente menores concentrações de cálcio iônico na saliva.

Estudos específicos serão conduzidos a fim de estudarmos a causa específica da menor concentração de cálcio na saliva de ratos SHR.

A concentração de proteínas, amilase e IgA não está alterada na saliva de ratos SHR.

Em humanos, o desenvolvimento (19-49 anos) foi associado ao aumento do fluxo salivar, principalmente de glândulas parótidas e ao aumento da concentração de proteínas totais na saliva⁶¹.

Em nosso estudo, a avaliação da concentração de proteínas totais na saliva não apontou diferença entre ratos normotensos e hipertensos nas diferentes idades. Entre ratos normotensos, evidenciamos uma tendência ao aumento da concentração de proteínas na saliva dos ratos aos 3 meses, porém não significativa ($p > 0,05$). Como em ratos Wistar houve aumento do fluxo salivar, mas não foi observada alteração na concentração de proteínas na saliva, poderíamos sugerir que um aumento na secreção de proteínas teria sido proporcional ao aumento do fluxo.

Ao compararmos ratos SHR de 30 dias e 3 meses, observamos um aumento significativo da concentração de proteínas salivares associado ao desenvolvimento do animal. Interessantemente, em ratos hipertensos este aumento ocorreu mesmo sem haver alteração do fluxo salivar, uma vez que o

fluxo salivar não foi diferente entre os ratos SHR. Estes dados mostram que a saliva de ratos SHR aos 3 meses seria menos fluida e mais protéica. Um aumento na concentração protéica poderia ser conseqüente de uma maior ativação adrenérgica nas células acinares das glândulas salivares associada à produção de saliva serosa. A estimulação das glândulas salivares com pilocarpina pode levar a secreção salivar com baixa concentração de proteínas. Em experimento realizado com ratos normotensos Sprague-Dawley (135-140 g) a secreção salivar estimulada com pilocarpina foi caracterizada por um aumento de fluxo salivar e baixa concentração de proteínas⁶³. Este efeito da pilocarpina estaria associado a estimulação de receptores muscarínicos envolvidos na transdução do sinal que leva a secreção de saliva fluida. Com isso, um aumento no volume líquido de saliva levaria a diluição da quantidade de proteínas, uma vez que a secreção protéica estaria associada à estimulação adrenérgica. Em nosso estudo todos os animais foram estimulados com mesmas doses de pilocarpina, e assim como observado por outros autores²⁶, ratos SHR produziram menor volume de saliva que os ratos normotensos.

Estes dados sugerem que embora as glândulas salivares de SHR secretem saliva, sua função é deficiente e a quantidade de proteína secretada não estaria associada diretamente ao fluxo salivar, uma vez que sem alteração de fluxo houve um aumento significativo da concentração de proteínas salivares em ratos SHR.

A amilase é sintetizada principalmente pelas células acinares e menos consistentemente pelas células proximais dos ductos intercalados, não havendo contribuição de amilase proveniente do fluido crevicular gengival, uma rota de entrada para algumas proteínas salivares, para a quantidade de amilase presente na saliva. Assim a amilase seria um bom indicador da função das glândulas salivares e também do efeito da saúde geral ou de fatores externos sobre a função destas glândulas.

Ao compararmos a atividade da amilase salivar entre filhotes de ratos normotensos e hipertensos, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre os resultados, corroborando com estudo²¹ realizado anteriormente em nosso laboratório. Na comparação da atividade da amilase salivar entre ratos Wistar de 30 dias e 3 meses, verificamos um aumento da atividade da amilase diretamente associado ao desenvolvimento do animal e ao aumento do fluxo

salivar, fato que provavelmente favoreceu a tendência ao aumento da concentração de proteínas observada na saliva de ratos Wistar aos 3 meses.

Em ratos SHR, observamos que os valores de atividade de amilase não diferiram entre as idades dos animais, sugerindo que provavelmente o aumento na concentração de proteínas associado ao desenvolvimento de SHR, como observado na saliva de SHR aos 3 meses, se deve ao aumento de outras proteínas salivares. Verificamos ainda que na saliva de ratos SHR, independentemente da idade, os valores de atividade de amilase salivar seriam altos e próximos aos obtidos na saliva de ratos Wistar aos 3 meses, apesar dos resultados não mostrarem diferenças significativas entre os grupos. Em algumas doenças crônicas como, por exemplo, pancreatite, diabetes mellitus insulina-dependente, insuficiência renal, anorexia, bulimia nervosa ^(apud 64) a atividade da amilase salivar está elevada. O alto consumo de álcool também aumenta a atividade da amilase salivar⁶⁴. Em estudo realizado com filhotes de ratos Sprague-Dawley, a deficiência de proteínas na dieta também levou ao aumento da atividade da amilase salivar³⁹. Nestes estudos, o aumento na atividade da amilase salivar sempre esteve diretamente associado à redução do fluxo salivar, e em alguns casos a redução da concentração de proteínas totais.

Entre todas as proteínas que poderiam ser encontradas na saliva dos animais estudados, além da amilase, avaliamos possíveis alterações na imunoglobulinas A (IgA). Esta avaliação específica foi baseada em estudos clínicos e experimentais prévios que associaram alterações imunológicas à hipertensão, uma vez que os níveis de imunoglobulina (Ig) estariam elevados em 20-40% em pacientes hipertensos essenciais, e que ratos SHR⁶⁵ apresentariam um aumento da IgA plasmática. As elevações de IgA no plasma, principalmente de IgA polimérica, estaria diretamente associada aos valores de pressão sanguínea sistólica influenciada pela linhagem do rato (SHR>Wistar), idade (idosos>jovens), e sexo (machos>fêmeas) e não seriam acompanhadas por mudanças de IgG ou IgM no plasma. Este estudo⁶⁵ sugeriu que as alterações do sistema imune de SHR, manifestado por elevação da concentração plasmática de IgA, estaria associado ao aumento de linfócitos circulantes, que sintetizam e secretam IgA.

Foi demonstrado ainda que doenças sistêmicas poderiam alterar a concentração de imunoglobulinas salivares. Em pacientes como diabetes mellitus, a concentração de IgA na saliva seria 30% maior que em indivíduos saudáveis¹. A imunoglobulina A (IgA) salivar atua como primeira linha no mecanismo de defesa da cavidade oral⁶⁶. Ela é produzida por células do plasma no tecido conjuntivo e transportada através de células do ducto das glândulas salivares⁴.

Com a concentração de IgA plasmática aumentada em SHR, um possível aumento desta imunoglobulina seria esperado na secreção salivar destes animais. No entanto, pelos resultados obtidos em nosso estudo, nenhuma diferença nos valores da concentração de IgA foi observado entre a saliva de ratos normotensos e hipertensos, nas idades estudadas.

6. Conclusão

6. Conclusão

Em ratos hipertensos o fluxo salivar, as concentrações de fluoreto e íons cálcio, atividade da amilase salivar e capacidade tamponante, mesmo havendo aumento do pH da saliva, não se alteraram com o desenvolvimento dos animais.

Nos ratos normotensos os parâmetros medidos como fluxo salivar, a concentração de proteínas, a atividade da amilase salivar, as concentrações de fluoreto e de cálcio, foram aumentados com desenvolvimento do animal.

Os resultados em conjunto sugerem que a hipertensão altera os parâmetros bioquímicos da saliva, e demonstram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são modelos experimentais de hipofunção salivar.

Referências
Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Doods MWJ, Johnson DA, Yeh C. Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry* 2005; 33: 223-33.
2. Nauntofte B, Tenovuo J, Lagerlöf F. Secreção e composição da saliva. In: Fejerskov O, Kidd E. *Cárie Dentária- A.doença e seu tratamento*. São Paulo: Livraria Editora Santos, 2007.p. 7-27.
3. de Almeida PDV, Gregio AMT, Machado MAN, Lima AAS, Azevedo LR. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *J Contemp Dent Pract* 2008 March; (9)3:072-080.
4. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85:162-9.
5. Levine MJ. Development of artificial salivas, *Crit Ver Oral Biol Med* 1993; 4;279-86.
6. Mandel ID. Impact of saliva on dental caries. *Compend Suppl* 1989: S476-81.
7. Tenovuo J, Lagerlöf F.. Saliva. In:Thylstrup A, Fejerkov O. *Cariologia Clínica*. São Paulo: Santos, 1994.p.17-43.
8. Cremer H-D, Büttner W. Absorption of fluoride. In: *Fluoride and human health*. Geneva: World Health Organization. 1970; 75-89.
9. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res* 1994 June; 8(1):5-14.
10. Douglas CR. A boca e os elementos minerais. In: Douglas CR. *Patofisiologia Oral*. São Paulo: Pancast, 1998. p. 645-657
11. Shahrabi M, Nikfarjam J, Alikhani A, Akhound N, Ashtiani M, Seraj B. A comparison of salivary calcium, phosphate, and alkaline phosphatase in children with severe, moderate caries, and caries free in Tehran's kindergartens. *J Indian Soc Pedod Prevent Dent*. 2008 Apr-Jun; 26(2): 74-7.
12. *Diagnosis and risk prediction of dental caries*. v. 2. Illinois: Quintessence books; 2000.

13. Ten Cate AR. Oral Histology: development, structure and function. 5th ed. St. Louis: Mosby; 1998.
14. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995; 6:161-75.
15. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992;172:305-12.
16. Yamori Y, Swales JD. The spontaneously hypertensive rat. In: Swales JD. *Textbook of hypertension*. Oxford: Blackwell Scientific Press; 1994. p. 447-55.
17. Dodds MWJ, Yeh C-K, Johnson DA: Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; 28: 373-81.
18. Psoter WJ, Reid BC, Katz RV. Malnutrition and Dental Caries: A Review of the Literature. *Caries Research* 2005; 39: 441-47.
19. Wlodek ME, Westcott KT, Ho PW, Serruto A, Di Nicolantonio R, Farrugia W, et al. Reduced fetal, placental and amniotic fluid PTH_RP in the growth-restricted spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R31-38;
20. Lerman LO, Chade AR, Sica V, Napoli C. Animal models of hypertension: An overview. *J Lab Clin Med* 2005; 146(3): 160-73.
21. Elias GP, Santos OAM, Sasaki KT, Delbem ACB, Antoniali C. Dental mineralization and salivary activity are reduced in offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR). *Journal of Applied Oral Science* 2006; 14 (4):253-59.
22. Tanase H, Yamori Y, Hansen CT, Lovenberg W. Heart size in inbred strains of rats. Part 1. Genetic determination of the development of cardiovascular enlargement in rats. *Hypertension* 1982; 4:864-72.
23. Yamori Y. Development of the spontaneously hypertensive rat and various spontaneous rat models, and their implications,

- in Handbook of Hypertension. Experimental and genetic models of hypertension 1984; 4:224-39.
24. Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Urabe H, Tsukakoshi M, Kasuya T, Yazaki Y. The elevation of the cytoplasmic calcium ions in vascular smooth cells in SHR – measurement of the free calcium ions in single living cells by laser microfluorespectrometry. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1986; 141: 340-45.
 25. Barker DJP. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci.*,1998;95:115-28.
 26. Kraly FS, Coogan LA, Specht SM, Trattner MS, Zayfert C, Cohen A, et al. Disordered drinking in developing spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1985; 248:R464-70.
 27. Schmid G, Geiger H, Bahner U, Heidland A. Glandular adenylate cyclase system in genetic hypertension: age-dependent response to catecholamines. *Eur J Pharmacol* 1988;147:397-402
 28. Bernarde MA, Fabian FW, Rosen S, Hoppert CA, Hunt HR. A method for collection of large quantities of rat saliva. *J Dent Res.*, 1956;35:326-27.
 29. Lowry OH, Rosebrough NS, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 1951;193:275-82.
 30. Lewis ML, Batchelor DC, Bassett NS, Johnston BM, Napier J, Skinner SJM. Perinatal Growth disturbance in the spontaneous hypertensive rat. *Pediatric Research*, 1997; 42: 1-7.
 31. Di Nicolantonio R, Koustsis K, Wlodek ME. Fetal versus maternal determinants of reduced fetal and placental growth in spontaneous hypertensive rat. *Journal of Hypertension*. 2000; 18:1-6.
 32. Wlodek ME, Koustsis K, Westcoott KT, Ho PW, Serruto A, Di Nicolantonio R. The spontaneous hypertensive rat fetus, not

- the mother, is responsible for its reduced amniotic fluid PTH_RP and growth restriction. *Placenta*. 2001; 22:646-651.
33. Di Nicolantonio R, Koustsis K, Westcott KT, Wlodek ME. Relative contribution of the prenatal versus postnatal period on development of hypertension and growth rate of the spontaneous hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2006; 33: 9-16.
 34. McCarty R, Fields-Okotcha C. Timing of preweaning maternal effects on development of hypertension on SHR rats. *Physiology and Behavior*. 1994; 55:839-844.
 35. Gouldsborough I, Black V, Johnson IT, Ashton N. Maternal nursing behavior and the delivery of milk to neonatal spontaneous hypertensive rat. *Acta physiologica Scandinavica*. 1998; 162:107-114.
 36. Wlodek ME, Westcott KT, Serruto A, O'Dowd R, Wassef L, Ho PWM, Moseley JM. Impaired mammary function and parathyroid hormone-related protein during lactation in growth-restricted spontaneously hypertensive rats. *Journal of Endocrinology*. 2003;178:233-245.
 37. Salivary glands and saliva. In: Roth GI, Calmes RB. *Oral Biology*. 1981.p.196-236.
 38. Johansson I, Saellstrom AK, Rajan BP, Parameswaran A. Salivary flow in dental caries in Indian children suffering from chronic malnutrition. *Caries Res* 1992; 26:38-43.
 39. Johansson I, Ericson T. Saliva composition and dental caries development during protein deficiency and β -receptor stimulation or inhibition. *J Oral Pathol*. 1987;16:145-149.
 40. Johansson I, Fagernas C. Effect of iron-deficiency anemia on saliva secretion rate and composition in the rat. *Arch Oral Biol*. 1994;39(1):51-56.
 41. Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia and salivary flow rates. *Oral surg oral med oral pathol oral radiol endod*. 2001;92:281-91.

42. Nederfors T, Dahlof C. Effects on salivary flow rate and composition of withdrawal of and re-exposure to the β_1 -selective antagonist metoprolol in a hypertensive patient population. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 262-268.
43. Johnson DA, Alvares OF, Etzel KR, Kalu DN. Regulation of salivary protein. *J Dent Res*. 1987;66(2):576-582.
44. Ryberg M, Möller C, Ericson T. Effect of β_2 -adrenoceptor agonist on saliva proteins and dental caries in asthmatic children. *J Dent Res*. 1987;66(8):1404-1406.
45. Dippete DJ, Christenson W, Nickols MA, Nickols. Cardiovascular responsiveness to parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein in genetic hypertension. *Endocrinology*. 1992; 130: 2045-51.
46. Aranha FL. Bioquímica da cárie dental. In: Aranha FL, Bioquímica Odontológica. São Paulo: Sarvier; 1996. P.74-101.
47. Bardow A, Nyvad B, Nauntofte B. Relationship between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and rate of tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol*. 2001; 46: 413-23.
48. Gresz V, Know TH, Vorum H, Zelles T, Kurtz I, Steward MC, Aalkjaer C, Nielsen S. Immunolocation of electroneural Na^+ - HCO_3^- cotransporters in human and rat salivary glands. *Am J Physiol*. 2002; 283: G473-G480.
49. Nguyen H, Stuart-Tilley A, Alper SL, Melvin JE. $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange is acetazolamide sensitive and activated by muscarinic receptor-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in salivary acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 283: G312-G320.
50. Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci*. 1989; 13:1-160..
51. Whitford GM, Sampaio FC, Pinto CS, Maria AG, Cardoso VES, Buzalaf MAR. Pharmacokinetics of ingested fluoride: Lack of effect of chemical compound. *Arch Oral Biol* 2008; 53(11):1037-41. .

52. Carvalho JG, Oliveira RC, Buzalaf MAR. Plasma as an indicator of bone fluoride levels in rats chronically exposed to fluoride. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(4):238-41.
53. Carvalho JG, Cestari TM, Oliveira RC, Buzalaf MAR. Fluoride effects on bone formation in young and old rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008; 30(4): 287-294.
54. Mandel ID. Salivary Diagnosis: Promises, promises. In: Malamud D, Tabak L. *Saliva as Diagnosis fluid - Annals of the New York Academy of Sciences.* 1993; 694: 1-10
55. Dunipace, AJ, Brizendine EJ, Zhang W. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res.* 1995, 74(1): 358-68.
56. Ekstrand J, Whitford GM. Fluoride metabolism: Longitudinal study in growing dogs. *J dent Res* 1984; 63: 206.
57. Zipkin I, McClure FJ. Deposition of fluorine in the bones and teeth of growing rat. *J. Nutr* 1952, 47: 611-620.
58. Glijer B, Peterfy C, Tenenhouse A. The effect of vitamin D deficiency on secretion of saliva by rat parotid gland in vivo. *J Physiol.* 1985; 363: 323-334.
59. Consensus: oral health effects of products that increase salivary flow rate. *JADA.* 1988; 116(May):757-759.
60. Maier H, Coroneo MT, Antonczyk G, Heidland A. The flow-rate dependent excretion of ionized calcium in human parotid saliva. *Arch Oral Biol.* 1979;24:225-227.
61. Lagerlof F, Ekstrand J. The effect of flow rate on the ionized calcium concentration of human parotid saliva. *Caries res.* 1982; 16:123-128.
62. Abdollahi M, Dehpour AR, Fooladgar M. Alteration of rat submandibular gland secretion of protein, calcium and N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity by lead. *Gen Pharmac.* 1997; 29; 675-680.
63. Ryberg M, Johansson I. The effects of long-term treatment with salmeterol and salbutamol on the flow rate and composition of whole saliva in the rat. *Archs oral Biol.* 1994;40(3): 187-191.

64. Enberg N, Alho H, Lomaranta V, Heinälä P, Lenander-Lumikari M. Salivary flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92(3):292-8.
65. Chen-Min C, Schachter David. Elevation of plasma immunoglobulin A in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 1993; 21:731-738.
66. Seemann R, Hagewald SJ, Sztankay V, Drews J. Levels of parotid and submandibular/sublingual salivary immunoglobulin A in response to experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Invest.* 2004; 8: 233-237.