



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ESTOMATOLOGIA**

SILVANA DA SILVA

**EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS (FLUOXETINA E VENLAFAXINA) E DA
PILOCARPINA SOBRE AS GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS**

CURITIBA

2007



SILVANA DA SILVA

**EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS (FLUOXETINA E VENLAFAXINA) E DA
PILOCARPINA SOBRE AS GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração: Estomatologia.

Orientação: Profa. Dra. Ana Maria Trindade Grégio

CURITIBA

2007

Silva, Silvana da
S586e Efeitos de antidepressivos (fluoxetina e venlafaxina) e da pilocarpina sobre
2007 as glândulas parótidas de ratos = Effects the antidepressants (fluoxetine and
venlafaxine) and pilocarpine on rat parotid glands / Silvana da Silva ;
[orientadora, Ana Maria Trindade Grégio]. – 2007.
92 f. ; 30 cm

Texto em português e inglês
Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2007
Inclui bibliografias

1. Saúde bucal. 2. Glândulas salivares. 3. Antidepressivos. 4. Xerostomia
5. Pilocarpina. 6. Estomatologia. I. Grégio, Ana Maria Trindade. II. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. III. Título. VI. Título: Effects the antidepressants (fluoxetine and
venlafaxine) and pilocarpine on rat parotid glands.
CDD 20. ed. – 617.601



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Clínica de Odontologia

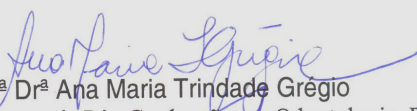
TERMO DE APROVAÇÃO

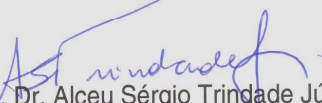
SILVANA DA SILVA

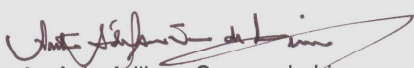
EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS (FLUOXETINA E VENLAFAXINA) E DA PILOCARPINA SOBRE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS. ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICA E SIALOMÉTRICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador(a):


Prof.ª Dr.ª Ana Maria Trindade Grégio
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Alceu Sérgio Trindade Júnior
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, FOB-USP


Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 14 de março de 2007.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

A Deus e à poderosa intercessão de Maria, a quem honramos com o título de Nossa Senhora do Carmo, por tudo que sou e principalmente por me guiarem nos caminhos da vida.

Aos meus pais, Gasparino Alexandre da Silva e Maria de Carvalho Silva, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, em especial meu irmão Francisco de Assis Silva, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional sempre.

Ao meu noivo, Marcelo Marcos Sapelli Silva, pelo amor, carinho, respeito, dedicação e por estar sempre ao meu lado, mesmo nas situações mais difíceis.

Aos queridos amigos Prof^a Dr^a Marina de Oliveira Ribas e Prof. Dr. Wilson Denis Martins que, além dos ensinamentos sobre os caminhos da Estomatologia, me mostraram o valor do carinho, amizade, respeito e dedicação profissional.

Ao amigo Vagner Júnior de Alencar Carreira por sempre acreditar em meu potencial.

À amiga Theresinha Rambo, pelo carinho, dedicação, amizade e por me ajudar na escolha do caminho certo diante das dificuldades.

À amiga Therezinha Pastre por todo carinho, amizade, ajuda e compreensão.

À aluna de graduação Miriam Vanessa Zaclikevis pelo empenho e dedicação em me ajudar a desenvolver esta pesquisa e pela amizade conquistada.

À Profª Drª Lenita Maria Aver Araújo (UFPel) por, na graduação, despertar em mim o interesse pela Estomatologia, através do incentivo ao estudo e amor à carreira acadêmica.

Ao diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sérgio Vieira, e ao coordenador do Mestrado em Odontologia, área de concentração Estomatologia, Prof. Dr. Fernando Henrique Westphalen pela realização deste curso.

À minha orientadora Profª Drª Ana Maria Trindade Grégio pela dedicação, acompanhamento e ensinamentos prestados, tornando possível a realização deste trabalho.

À Profª Drª Luciana Reis de Azevedo pela atenção, dedicação, competência e auxílio prestado durante a execução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela dedicação e paciência no ensino da bioestatística, e pelo grande auxílio neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima pelo auxílio prestado em momentos de dúvidas.

Aos amigos Prof. Dr. Júlio César Bisinelli, Prof. Dr. Santo Gentil Forone e Prof. Narcizo José Grein pelo carinho, respeito e amizade.

Aos professores do Mestrado em Odontologia, área de concentração Estomatologia pelos conhecimentos técnico-científicos transmitidos e pela grande colaboração.

Aos colegas do mestrado em Odontologia, áreas de concentração em Estomatologia, Saúde Coletiva, Ortodontia e Dentística pela convivência durante estes dois anos.

Aos funcionários do Biotério Central da PUCPR, Indalécio Mainardes Sutil (médico veterinário), Charlei Pires Melo, Alaércio Zeglan e Antônia Sueli da Silva pela importante colaboração.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, em especial a bióloga Ana Paula Camargo Martins.

Aos bibliotecários Lúcia Littiere e Adriano Lopes pela grande colaboração.

A todos os funcionários da Clínica de Odontologia pelo auxílio indispensável durante o período deste curso de Mestrado.

À secretária Neide Reis Borges pela amizade e todo apoio oferecido.

Enfim, a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

“Leve na memória, para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

(Chico Xavier)

RESUMO

SILVA, Silvana da. **EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS (FLUOXETINA E VENLAFAXINA) E DA PILOCARPINA SOBRE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS**. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Trindade Grégio. Curitiba: PUCPR 2007, Mestrado em Odontologia, Área de Concentração: Estomatologia.

Este estudo avaliou o efeito dos antidepressivos, Fluoxetina e Venlafaxina, sobre o tamanho (T), massa (M), volume celular (VC), das glândulas salivares parótidas de ratos e a velocidade do fluxo salivar (VFS). Além disso, avaliou a ação secretagoga da pilocarpina sobre este fluxo. Noventa animais foram divididos em 9 grupos de tratamento com os antidepressivos, antidepressivos associados à aplicação de pilocarpina, antidepressivos e soro fisiológico, soro fisiológico (controle) e pilocarpina (controle positivo). Trinta horas após o término do tratamento procedeu-se a coleta de saliva para determinar a VFS. Em seguida, as glândulas salivares foram removidas, T e M mensurados, e os espécimes processados para análise histomorfométrica e determinação do VC. A variável T apresentou aumento estatisticamente significativo entre os grupos que foram tratados por 30 dias com Fluoxetina ($p=0,0002$) e Venlafaxina ($p=0,0112$) quando comparados ao grupo tratado com soro fisiológico (controle). O grupo tratado com Fluoxetina (30 dias) revelou aumento da M ($p=0,0190$) e diminuição da VFS ($p=0,0031$), estatisticamente significantes, quando comparado ao grupo controle. O VC revelou aumento das células acinares entre os grupos Fluoxetina (30 dias) ($p=0,0005$) e Venlafaxina (30 dias) ($p=0,0004$) também quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com Venlafaxina por 60 dias em associação com pilocarpina apresentou VFS semelhante ao grupo controle tratado por 60 dias. Conclui-se que, tanto a Fluoxetina quanto a Venlafaxina reduziram a VFS e causaram aumento do VC, acarretando em hipertrofia das glândulas, tendo a Fluoxetina uma ação anticolinérgica mais pronunciada. A pilocarpina aumentou a VFS no grupo que recebeu Venlafaxina.

Palavras-Chave: Antidepressivos. Xerostomia. Hipossalivação

ABSTRACT

SILVA, Silvana da. **EFFECTS THE ANTIDEPRESSANTS (FLUOXETINE AND VENLAFAXINE) AND PILOCARPINE ON RAT PAROTID GLANDS.** Guidance: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Trindade Grégio. Curitiba: PUCPR 2007, Post-graduation student in Dentistry, Department of Stomatology.

This study assessed the effect of the antidepressants, Fluoxetine and Venlafaxine, on the size (GS), mass (M), cellular volume (CV), of rat parotid salivary glands and salivary flow rate (SFR), as well as the secretagogue action of pilocarpine on this flow. Ninety animals were divided into 9 treatment groups with the antidepressants, antidepressants associated with the application of pilocarpine, antidepressants and physiologic serum, physiologic serum (control) and pilocarpine (positive control). Thirty hours after the end of treatment, saliva collection began, to determine the SFR. Next, the salivary glands were removed, GS and M measured, and the specimens processed for histomorphometric analysis and CV determination. The variable GS presented statistically significant increase among the groups that were treated for 30 days with Fluoxetine ($P=0.0002$) and Venlafaxine ($P=0.0112$) when compared with the group treated with physiologic serum (control). The group treated with Fluoxetine for 30 days revealed increase in M ($P=0.0190$) and diminished SFR ($P=0.0031$), statistically significant, when compared with the control group. CV revealed increase in acinic cells between the Fluoxetine (30 days) ($P=0.0005$) and Venlafaxine (30 days) ($P=0.0004$) groups as well, when compared with the control group. The group treated with Venlafaxine for 60 days in association with pilocarpine presented SFR similar to the control group treated for 60 days. Both Fluoxetine and Venlafaxine reduced the SFR and caused increase in CV, resulting in hypertrophy of the glands, with Fluoxetine having a more pronounced anticholinergic action. The pilocarpine increased the SFR in the group that received Venlafaxina.

Keywords: Antidepressants. Xerostomia. Hiposalivation

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM PORTUGUÊS	11
2 ARTIGO EM INGLÊS.....	41
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	70
ANEXO B – MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS	71
ANEXO C – ANÁLISE ESTATÍSTICA DETALHADA.....	78
ANEXO D – NORMAS DA REVISTA	86

1 - ARTIGO EM PORTUGUÊS

EFEITOS DE ANTIDEPRESSIVOS (FLUOXETINA E VENLAFAXINA) E DA PILOCARPINA SOBRE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS

Silvana da Silva¹ Luciana Reis de Azevedo ² Antônio Adilson Soares de Lima³
Sérgio Aparecido Ignácio⁴ Ana Maria Trindade Grégio⁵ *

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

¹ Aluna de Mestrado em Odontologia, área de Concentração Estomatologia. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua: Frederico Maurer, 1948, Hauer 81670-020, Curitiba - Paraná – Brasil. E-mail: silvanaodonto@gmail.com

² Professor Adjunto (Estomatologia) do Curso de Odontologia. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba -Paraná –Brasil. E-mail: l.azevedo@pucpr.br.

³ Professor Titular (Estomatologia) do Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba -Paraná – Brasil. E-mail: a.lima@pucpr.br.

⁴ Professor Titular (Bioestatística) do Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba - Paraná- Brasil. E-mail: sergioai@pucpr.br

⁵ Professora Titular (Farmacologia) do Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Rua Professor Luiz César 873 apto 202, Água Verde – 80.620-280, Curitiba- Paraná-Brasil. E-mail: ana.gregio@pucpr.br

* Autor correspondente: Telefone 55 41 32712537/32711637; email: ana.gregio@pucpr.br (Ana Maria Trindade Grégio)

Resumo

Este estudo avaliou o efeito dos antidepressivos, Fluoxetina e Venlafaxina, sobre o tamanho (T), massa (M), volume celular (VC), das glândulas salivares parótidas de ratos e a velocidade do fluxo salivar (VFS). Além disso, avaliou a ação secretagoga da pilocarpina sobre este fluxo. Noventa animais foram divididos em 9 grupos de tratamento com os antidepressivos, antidepressivos associados à aplicação de pilocarpina, antidepressivos e soro fisiológico, soro fisiológico (controle) e pilocarpina (controle positivo). Trinta horas após o término do tratamento procedeu-se a coleta de saliva para determinar a VFS. Em seguida, as glândulas salivares foram removidas, T e M mensurados, e os espécimes processados para análise histomorfométrica e determinação do VC. A variável T apresentou aumento estatisticamente significativo entre os grupos que foram tratados por 30 dias com Fluoxetina ($p=0,0002$) e Venlafaxina ($p=0,0112$) quando comparados ao grupo tratado com soro fisiológico (controle). O grupo tratado com Fluoxetina (30 dias) revelou aumento da M ($p=0,0190$) e diminuição da VFS ($p=0,0031$), estatisticamente significantes, quando comparado ao grupo controle. O VC revelou aumento das células acinares entre os grupos Fluoxetina (30 dias) ($p=0,0005$) e Venlafaxina (30 dias) ($p=0,0004$) também quando comparados ao grupo controle. O grupo tratado com Venlafaxina por 60 dias em associação com pilocarpina apresentou VFS semelhante ao grupo controle tratado por 60 dias. Concluiu-se que, tanto a Fluoxetina quanto a Venlafaxina reduziram a VFS e aumentaram o VC, acarretando em hipertrofia das glândulas, tendo a Fluoxetina uma ação anticolinérgica mais pronunciada. A pilocarpina aumentou a VFS no grupo que recebeu Venlafaxina.

Palavras-Chave: Antidepressivos, Xerostomia, Hipossalivação

Introdução

A salivação normal é uma exigência essencial para a saúde bucal devido suas contribuições importantes aos mecanismos de defesas da boca. A secreção salivar diminuída pode conduzir à doença cárie e à deterioração da mucosa¹⁻³.

A secreção salivar é neurologicamente controlada pela estimulação de ação reflexa. As glândulas salivares são inervadas pelo sistema nervoso autônomo (SNA) simpático e parassimpático. A inervação simpática é ligada por meio de receptores do tipo α_2 e β_2 adrenérgicos⁴. Enquanto a parassimpática possui ligação com o receptor muscarínico M3. O conteúdo acinar primário é modificado à medida que ocorre sua passagem pelos sistemas de ductos da glândula salivar. Este processo ocorre uma vez que as células do ducto recebem o estímulo das vias simpática e parassimpática⁵.

A depressão constitui-se a forma mais comum dos distúrbios afetivos, podendo variar de discreta a grave. Vários estudos trabalham com a hipótese de que a depressão provém da deficiência das monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina), sendo o tratamento mais adequado a elevação do suprimento destes neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). Dados estatísticos demonstram que a depressão tem aumentado em função da maior expectativa de vida, sendo comum na população de terceira idade⁶.

O tratamento das desordens psiquiátricas e distúrbios de afeto envolve principalmente fármacos antidepressivos, antipsicóticos e ansiolíticos. Estudos relatam que pacientes com alterações psiquiátricas que fazem uso destes fármacos queixam-se de boca seca⁷. As alterações depressivas acompanhadas do sintoma de boca seca são 20% mais freqüentes em mulheres do que em homens⁸. A faixa etária mais atingida está entre 30 e 59 anos⁵.

Os antidepressivos possuem afinidade pelos receptores adrenérgicos e colinérgicos presentes nas glândulas salivares e apresentam efeito anticolinérgico. A ação das drogas antidepressivas pode estar relacionada a esta afinidade e à redução do influxo colinérgico e simpático ao SNC. O principal efeito colateral destas drogas é a inibição do efeito secretagôgo causado pelo estímulo colinérgico, causando desta forma, hipossalivação⁹. Outros efeitos colaterais incluem: náuseas, tonturas, sonolência, sudorese e tremores¹⁰.

A Fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) e entre outros da mesma classe, é o resultado de uma pesquisa para encontrar medicamentos tão eficazes quanto os tricíclicos, mas com poucos problemas de tolerabilidade e segurança. Esta droga não inibe a recaptação de outros neurotransmissores, não tendo afinidade pelos receptores adrenérgicos, colinérgicos, muscarínicos, H1-histamínicos, ou dopamínicos¹¹. Embora sejam consideradas drogas seguras e apresentem facilidade para atingir a dose terapêutica, os ISRSs apresentam significativos efeitos colaterais como: náuseas, diarreia, diminuição da libido, cefaléia, insônia e xerostomia¹².

A Venlafaxina é um fármaco antidepressivo com estrutura química totalmente diferente de outros agentes antidepressivos. Seu mecanismo de ação assemelha-se ao de outros antidepressivos conhecidos como: fluoxetina, sertralina e paroxetina, já que está diretamente associado à potenciação da atividade neurotransmissora no SNC^{13, 14}.

Esta droga apresenta-se como inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina, e apresenta fraca atividade como inibidor da recaptação de dopamina, clinicamente significativo apenas em doses elevadas¹¹. Não apresenta afinidade por receptores adrenérgicos α_1 , receptores muscarínicos ou

histamínicos^{11, 15}. Conseqüentemente, é menos provável que produza efeitos colaterais relacionados a estas propriedades farmacológicas¹⁶.

Vários tratamentos são propostos para melhorar a secreção salivar, entre eles está o uso de um fármaco estimulador do fluxo salivar, o cloridrato de pilocarpina, droga sialogôga que atua por estimulação do SNA parassimpático¹⁷. Este fármaco tem sido utilizado por estimular os receptores colinérgicos, dentre eles o receptor muscarínico M3 presente nas glândulas salivares, acarretando na expulsão do conteúdo salivar armazenado¹⁸, observando-se, desta forma um aumento na produção e liberação da saliva com o uso da pilocarpina¹⁹.

O presente estudo teve como objetivo verificar a ação de duas drogas da classe dos antidepressivos, Fluoxetina e Venlafaxina sobre a velocidade do fluxo salivar. Adicionalmente, fazer uma análise histomorfométrica das glândulas parótidas de ratos submetidos a tratamento crônico com tais drogas, assim como avaliar a ação secretagôga da pilocarpina sobre este fluxo.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em animais da Universidade Tuiuti do Paraná (CEP-UTP nº 55/2003).

Amostra

Foram utilizados 90 ratos machos do tipo *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *mammalia* da linhagem *Wistar* (oriundos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná), com peso aproximado de 250g, que foram mantidos em gaiolas plásticas com água e comida *ad libidum*, respeitando o fotoperíodo de doze horas, e aclimatados ao ambiente laboratorial.

Os animais foram divididos em 9 grupos, cada grupo constituído por 10 animais (Tabela 1). Os grupos experimentais receberam dois fármacos

antidepressivos, solução injetável de Fluoxetina (lote 20040625, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil) e Venlafaxina (lote D/VN/002/02, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil) diariamente. Os grupos controle S30 e S60 receberam solução injetável de soro fisiológico e o grupo P60 recebeu gel em ora base preparado com 1% de hidrocloreto de pilocarpina (Gerbras Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil).

Sialometria

Segundo a metodologia descrita por Onofre²⁰, 30 horas após o término do tratamento procedeu-se a coleta da saliva. Os animais receberam duas gotas de pilocarpina a 4% (Allergan pilocarpina[®] 4%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., Guarulhos, Brazil) via oral, para estimular a salivação. Após um minuto, a saliva foi coletada num pote coletor universal que foi pesado em balança de alta precisão - Belmark[®] U210A (Bel Engenharia, Piracicaba, Brasil), obtendo-se desta forma a velocidade do fluxo salivar (VFS).

Os valores da velocidade do fluxo salivar estimulado foram obtidos por gravimetria de acordo com a seguinte fórmula^{21, 22}:

$$\frac{\text{PESO DO POTE APÓS A COLETA(g)} - \text{PESO DO POTE ANTES DA COLETA(g)}}{\text{TEMPO(1min)}} = \text{VELOCIDADE DO FLUXO SALIVAR (mL/min)}$$

Excisão da Glândula parótida e medida de seu tamanho

Após o término de cada tratamento, os animais foram devidamente anestesiados e mortos por meio da administração intraperitoneal de Tiopental

Sódico (Thionembutal[®], Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) na dose de 100mg/kg.

As glândulas parótidas direita e esquerda foram removidas e medidas (no sentido longitudinal) com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 500 Mical[®] (Mitutoyo Co. Tokio, Japão) e pesadas em balança de alta precisão Belmark[®] U210A (Bel Engenharia, Piracicaba, Brasil), obtendo-se assim o tamanho e a massa de cada glândula, respectivamente. Foi realizada a média do tamanho e da massa das glândulas, para obtenção das variáveis tamanho (T) e massa (M) para cada animal. Após a mensuração da peça, esta foi colocada em um recipiente previamente identificado, contendo formol a 10% por 48h. As peças cirúrgicas foram então seccionadas transversalmente seguindo o sentido epitélio-conjuntivo.

Os espécimes foram processados de acordo com a rotina do laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, e confeccionadas as lâminas contendo dois cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (com 4 µm de espessura), sendo um de cada glândula.

As lâminas foram examinadas em microscópio Olympus[®] BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), utilizando objetivas de 40X e 100X (com óleo de imersão). As imagens foram capturadas com câmera digital Sony[®] CCD-IRIS DXC-107A (Sony Electronics Inc., Tokio, Japão) acoplada ao microscópio e a um microcomputador. Com auxílio de um programa para análise de imagens (Image-Pro[®] Plus, Cybernetics, Silverspring, EUA), avaliou-se os cortes histológicos frente à utilização dos antidepressivos e da pilocarpina.

Análise histomorfométrica

Para estabelecer as comparações entre os grupos, com relação a alterações do volume celular (VC), utilizaram-se as variáveis apresentadas no estudo de Onofre et al. (1997).

O volume da glândula salivar processada (V_p) foi calculado por meio da seguinte fórmula: $V_p = m/d.rf$, onde m foi a massa fresca, d a densidade e rf o encolhimento ou dobramento causado pelo processamento histológico. Para este cálculo, $d = 1.089 \text{ g/cm}^3$ e $rf = 0,7$.

Para o cálculo da densidade do volume acinar (V_{vi}) utilizou-se a objetiva de 40X acoplada ao programa Image-Pro® Plus, onde se obteve uma grade com dez linhas horizontais e dez linhas verticais, determinando cem pontos, dos quais quarenta, foram escolhidos ao acaso. Nesses quarenta pontos escolhidos foram contados quantos pontos coincidiam com ácinos (P_i). Calculou-se, então, o V_{vi} por meio da fórmula: $V_{vi} = P_i/P_t$, onde P_t refere-se ao número de pontos selecionados (40).

O volume total acinar foi obtido pela fórmula: $V_{ti} = V_{vi}.V_p$.

O volume dos núcleos das células acinares foi determinado pelas medidas do diâmetro ortogonal de 50 núcleos de cada grupo, usando a objetiva de 100X. Primeiro calculou-se o raio de cada núcleo com a fórmula $r^2 = d_1.d_2$ e o volume nuclear pela expressão $V = 4/3.\pi.r^3$.

O volume do citoplasma foi calculado a partir do volume da densidade do núcleo e do citoplasma²³. Em cada lâmina foi contado o número de pontos que coincidiam com os núcleos (P_n) e com o citoplasma (P_{city}) das células acinares da glândula. A correção da densidade do volume nuclear (P_{ncorr}) foi calculada pela expressão $P_{ncorr} = (P_n/P_n + P_{city})/K_0$. Este fator de correção recebeu o nome de K_0

pelo cálculo da fórmula $K_0=1+3t/2d$, onde foi a densidade de cada núcleo e t a espessura do corte da lâmina.

Para corrigir a densidade do volume do citoplasma usou-se a equação $P_{cyticorr} = 1 - P_{ncorr}$.

Da divisão do $P_{cyticorr}$ pelo P_{ncorr} foi obtido o Rc/n , citoplasma sobre núcleos das células acinares: $Rc/n = P_{cyticorr}/P_{ncorr}$.

Finalmente, calculou-se o volume citoplasmático (V_{cyti}) pela fórmula $V_{cyti} = V_{ni} \cdot Rc/n$ e o volume celular (VC) pela fórmula $VC = V_{ni} + V_{cyti}$.

Análise Estatística

Para testar o pressuposto de normalidade das variáveis para cada grupo foi utilizado o teste de Komolgorov-Smirnov. O teste de Levene verificou a homogeneidade de variâncias entre os grupos.

Quando a análise de variância Anova acusou diferenças entre as médias dos grupos e tratamento, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD para as variáveis que apresentaram homogeneidade de variâncias entre os grupos. Para as variáveis que não apresentaram homogeneidade de variâncias entre os grupos, utilizou-se o teste de Games-Howell.

Para todos os testes foi aplicado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Todos os grupos apresentaram normalidade de distribuição dos dados para as variáveis T, M, VFS e VC das glândulas estudadas ($p > 0,05$), com exceção da variável VFS no grupo S60, da variável T nos grupos FS e S30 e da variável M no grupo F30.

As variáveis T e M mostraram homogeneidade de variância ($p > 0,05$) e as variáveis VFS e VC não apresentaram homogeneidade de variância ($p < 0,05$).

A amostra foi dividida em grupos de tratamento crônico por períodos de 30 e 60 dias de acordo com a medicação e as associações utilizadas, descritas no tabela 1.

Grupos tratados por 30 dias

A tabela 2 mostra as médias e desvios padrão das variáveis estudadas de acordo com os grupos tratados por 30 dias.

Houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias da variável T entre os seguintes grupos: F30 ($p=0,0002$), V30 ($p=0,0112$), quando comparados ao grupo S30 (controle).

Para a variável M, houve diferenças estatisticamente significantes para os grupos: F30 e V30 ($p=0,0011$), F30 e S30 ($p=0,0190$), pertencendo ao grupo F30 a maior média e ao grupo V30 a menor média.

A variável VFS apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos: F30 e S30 ($p=0,0031$).

VC revelou diferenças estatisticamente significantes entre os seguintes grupos: F30 (figura 1) e S30 ($p=0,0005$), V30 e S30 ($p=0,0004$).

As figuras 2 e 3 mostram glândulas parótidas de rato dos grupos V30 e S30, respectivamente.

Grupos tratados por 60 dias

As tabelas 3 e 4 mostram as médias e desvios padrão das variáveis estudadas de acordo com os grupos tratados por 60 dias.

A variável T não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. O grupo P60 apresentou a maior média e o grupo FP a menor média entre os grupos.

A variável M mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos P60 e FP ($p=0,0351$), FS e FP ($p=0,0161$), VS e FP ($p=0,0015$), VS e S60 ($p=0,0132$).

Para VFS houve diferenças estatisticamente significantes entre os seguintes grupos: P60 e VS ($p=0,0047$), P60 e FP ($p=0,0451$), VS e VP ($p=0,0214$). Os valores da VFS para todos os grupos, podem ser observados no gráfico 1.

VC mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos P60 e VS ($p=0,0231$), P60 e VP ($p=0,000003$), FS e VP ($p=0,0005$), VS e VP ($p=0,0111$), VP e FP ($p=0,0327$), VP e S60 ($p=0,0001$). O grupo P60 obteve a menor média e o grupo VP a maior média.

Discussão

O efeito anticolinérgico das drogas de ação sobre o SNC ainda não está totalmente esclarecido. A maioria dos autores opta por definir a capacidade autonômica destas em ligar-se aos receptores adrenérgicos e colinérgicos, alterando a qualidade e a quantidade do fluxo salivar. Mas, vários outros fatores devem ser considerados, pois além da interação e afinidade sobre o SNC e SNA simpático e parassimpático, outros neuromediadores, proteínas e aminoácidos são capazes de resultar em alteração da atividade sobre as glândulas salivares⁵.

Este estudo observou que a Fluoxetina (F30) produziu aumento do T e da M das glândulas salivares parótidas de rato, além de aumento do VC em relação ao grupo controle S30. Este efeito provavelmente ocorreu, porque as drogas de ação central promovem uma hipertrofia das células das glândulas salivares⁹. Tal resultado corrobora com os de Madrigal e Micheau²⁴, que caracterizam a hipertrofia das glândulas por um alargamento do ácino e acúmulo de grânulos de secreção, ocasionada por drogas de ação central.

A ação anticolinérgica das drogas psicotrópicas^{24,5} foi mais uma vez comprovada, pois para o grupo tratado com Fluoxetina por 30 dias (F30), a VFS dos animais foi menor em relação ao grupo controle (S30), justificando assim, o aumento do T e M, pois provavelmente houve retenção de saliva dentro do lume acinar e pouca liberação da mesma.

Os antidepressivos ISRSs quando comparados aos tricíclicos, não apresentam efeitos significativos nas taxas de fluxo, provavelmente devido a sua falta relativa de atividade anticolinérgica^{25, 26}. A redução do fluxo pode ocorrer por meio da ação dos receptores de serotonina presentes na microcirculação periférica²⁷. Segundo Schubert e Izutsu²⁸, o fluxo salivar pode ser afetado pelas medicações através de alterações no fluxo sanguíneo das glândulas salivares. Para Grubb e Karas²⁹, a serotonina tem importante papel fisiológico na regulação autonômica, pois, uma vez que o SNC controla o simpático, o parassimpático e ainda os mecanismos serotoninérgicos, provavelmente uma supressão ou ativação da liberação de serotonina no SNC resultaria de uma alteração tanto no simpático quanto no parassimpático. Tais hipóteses contribuem com nossos achados em relação à redução da VFS ocasionada pela Fluoxetina.

A incerteza quanto ao modo bioquímico exato de ação dos antidepressivos faz com que o desenvolvimento de novos fármacos seja freqüentemente empírico. Isto levou a introdução de um grupo heterogêneo de compostos (ao qual pertence a Venlafaxina), os antidepressivos atípicos. Na prática, os fármacos mais recentes podem ser definitivamente superiores aos tricíclicos em termos de efeitos colaterais e toxicidade aguda, porém não demonstram ter ação mais rápida nem ser mais eficazes^{11, 27, 26}.

Quanto aos resultados obtidos pela Venlafaxina (V30), tanto o T quanto o VC, foram maiores em relação ao grupo controle e ainda houve uma diminuição da VFS se comparados ao controle (S30), mais uma vez demonstrando a ação anticolinérgica de drogas psicotrópicas e o efeito da hipertrofia de células acinares^{9,24}.

A Venlafaxina possui menos efeitos anticolinérgicos e α -bloqueadores adrenérgicos do que os outros antidepressivos¹⁶. Isto causaria redução dos efeitos adversos, pois em baixas doses esta droga bloqueia predominantemente a recaptação de serotonina e noradrenalina e em altas doses inibe recaptação também de dopamina. Esta hipótese reforça a grande expectativa do uso da Venlafaxina em relação a Fluoxetina, concordando com nossos achados uma vez que o valor da VFS para a Venlafaxina (V30) foi maior quando comparado ao valor da VFS para a Fluoxetina (F30). Além disso, a Fluoxetina possui metabólito de ação prolongada e farmacologicamente ativo¹¹.

As células acinares apresentam receptores adrenérgicos α e β , receptores para peptídeo intestinal vasoativo (VIP), acetilcolina e substância P. Os receptores β adrenérgicos e para VIP, acionam a cascata do AMP cíclico, ativando a proteína G, e conseqüentemente, a enzima adenilato ciclase. Já os receptores α adrenérgicos e os receptores para acetilcolina e substância P acionam a cascata do inositol 1, 4, 5 trifosfato (IP3) e do diacilglicerol. Estas sequências de reações e interações bioquímicas influenciam tanto na secreção quanto na composição salivar³⁰.

A Venlafaxina por ser um fraco inibidor da recaptação de serotonina e noradrenalina possui menos efeitos colaterais do que a Fluoxetina²⁷. Outra hipótese para se justificar, além das outras anteriormente citadas, é o fato de que a maioria dos tipos de receptores serotoninérgicos está acoplada as proteínas G afetando a

atividade da adenilato ciclase³¹. Esta enzima, por sua vez, converte ATP no segundo mensageiro o AMP cíclico³², que apresenta como efeito central a ativação da proteína quinase A (PKA), uma enzima que regula canais iônicos, os quais são responsáveis pela entrada e saída de água e eletrólitos das células³³.

Por outro lado, o VC das glândulas parótidas de rato do grupo tratado com Venlafaxina (V30) foi maior do que no grupo tratado com Fluoxetina (F30). Isto provavelmente se deva ao fato de que a Venlafaxina, por inibir também a recaptação de noradrenalina e esta ser o mediador do SNA simpático que por sua vez tende a modular a composição da saliva induzindo mecanismo de secreção protéica^{34, 30}, que pode estar se acumulando dentro da glândula salivar, acarretando em hipertrofia celular.

Neste estudo observou-se o papel secretagôgo da pilocarpina, pois o grupo de animais que recebeu pilocarpina por 60 dias mostrou maior valor médio da VFS quando comparado ao grupo S60, ou seja, a pilocarpina ativa os receptores muscarínicos M3 presentes na glândula salivar que promovem aumento da liberação de secreção salivar³⁵.

Para a Fluoxetina, o grupo tratado por 30 dias e em seguida por mais 30 dias com associação da pilocarpina (FP) teve VFS menor do que o grupo S60. O grupo tratado com Venlafaxina por 30 dias e em seguida tratado por mais 30 dias, com a associação de pilocarpina (VP) teve VFS semelhante ao grupo S60. Neste caso, a pilocarpina conseguiu restituir a VFS em níveis de controle, corroborando com a ação secretagôga da pilocarpina no tratamento da hipossalivação causada pela Venlafaxina.

Os grupos FS e VS apresentaram VFS menor que o grupo S60 demonstrando que, após a suspensão da droga podem ocorrer os sintomas da retirada que

aparecem dentro de um a dez dias e persistir por até três ou quatro semanas. Os sintomas mais freqüentes são tonturas, vertigens ataxia, transtornos gastrintestinais, sintomas gripais, distúrbios sensoriais, alterações do sono, alterações psíquicas e efeitos anticolinérgicos. Assim como acontece com outras substâncias psicoativas, estes sintomas podem ser o resultado de alterações adaptativas que mais freqüentemente envolvem o ajuste de receptores para compensar a atividade farmacológica da droga, descritas como efeito rebote¹¹.

O avanço da pesquisa em psicofarmacologia de antidepressivos vem oferecendo aos pacientes fármacos com perfis farmacocinéticos bastante diferentes entre si. Apesar disto, os mecanismos de ação propostos para cada um deles permanecem vinculados às teorias monoaminérgicas, de aumento da oferta de neurotransmissores na fenda sináptica e da subsensibilização de receptores pré-sinápticos³⁶.

Em termos de número de drogas disponíveis, houve uma considerável ampliação do arsenal terapêutico, tanto com a expansão do número de compostos do mesmo grupo farmacológico, quanto com o surgimento de drogas com perfil de ação diferente das originais. Os compostos mais recentes são mais seletivos, levando à maior tolerabilidade e aderência ao tratamento¹¹.

Verifica-se um esforço no sentido de aperfeiçoar cada vez mais a ação em sítios receptores determinantes da eficácia clínica, evitando aqueles responsáveis pelos efeitos colaterais²⁵. Contudo, novas investigações tornam-se necessárias, devido à complexidade dos eventos envolvidos no mecanismo de secreção salivar.

Conclusões

Pode-se concluir que, tanto a Fluoxetina quanto a Venlafaxina reduziram a VFS e causaram hipertrofia da glândula parótida de rato, tendo a Fluoxetina uma

ação anticolinérgica mais pronunciada. A pilocarpina contribuiu para aumentar a VFS, principalmente no grupo que recebeu Venlafaxina, sugerindo o uso de pilocarpina para tratamento da hipossalivação causada por este fármaco.

Agradecimentos

Os autores agradecem a bióloga Ana Paula Camargo Martins – técnica responsável pelo Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, aos funcionários do Biotério Central da PUCPR (em especial ao médico veterinário Indalécio Mainardes Sutil) e às alunas de iniciação científica da PUCPR (PIBIC) Miriam Vanessa Zaclikevis e Anna Clara Durczak D'Agulham pela valiosa contribuição na conclusão deste trabalho.

Referências

- 1 - Mandel ID, Wotman S. The salivary secretions in health and disease. *Oral Sci Rev* 1976; 8:25-47.
- 2 - Mandel ID. Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1980; 12:321-366.
- 3 - Narhi TO. Prevalence of subjective feelings of dry mouth in the elderly. *J Dent Res* 1994; 73:20-25.
- 4 - Baum BJ. Neurotransmitter control of salivation. *J Dent Res* 1987;66:628-632.
- 5 - Scully CBE. Drugs effects on salivary glands: dry mouth. *Oral diseases* 2003; 9:165-176.
- 6 - Glassman AH, Carino JS, Roose SP. Adverse effects of tricyclic antidepressants: focus on the elderly. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1984; 39: 391-398.
- 7 - Thomsom WM, Chalmers JM, Spencer AJ, Slade GD. Medication and dry mouth: findings from a cohort study of older people. *J Public Health Dent* 2000; 60:12-20.
- 8 - Bogetto F, Maina G, Ferro G, Carbone M, Gandolfo S. Psychiatric comorbidity in patients with burning mouth syndrome. *Psychosomatic Med* 1998; 60: 378-385.
- 9 - Grégio AMT, Durscki JRC, Lima AAS, Machado MAN, Ignácio SA, Azevedo LR. Association of amitriptyline and Diazepam on histomorphometry of rat parotid glands. *Pharmacologyonline* 2006; 2:96-108.
- 10 - Horst WD, Preskorn SH. Mechanism of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. *J Affective Disord* 1998; 51:237-254.

- 11 - Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev Bras Psiquiatr* 1999; 21: 24-40.
- 12 - Goldstein BJ, Goodnick PJ. SSRIs in the treatment of affective disorders III. Tolerability, safety and pharmacoeconomics. *J Clin Psychopharmacol* 1998; 12:55-88.
- 13 - Ballone GJ. Psiqu Web/: antidepressivos atípicos GJ Ballone [homepage da internet]. [Atualizado em 15 de maio de 2005; Acesso em 26 de novembro de 2006]. Disponível em: <www.psiqweb.med.br>
- 14 - Almeida RN. *Psicofarmacologia – fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.25-45.
- 15 - Diaz-Martinez A, Benassinni O, Ontiveros A, Gonzalez S, Salin R, Basquedano G, Martinez RA. A randomized, open-label comparison of venlafaxine and fluoxetine in depressed outpatients. *Clin Ther* 1998; 20:467-476.
- 16 - Denys D, van der Wee N, van Megen HJ, Westenberg HG. A double blind comparison of venlafaxine and paroxetine in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 2003; 23:568-575.
- 17 - Vivino FB, Al-Hasshimi I, Khan Z, Leveque FG, Salisbury PL 3rd, Tran-Johnson TK, Muscoplat CC, Trivedi M, Goldlust B, Gallagher SC. Pilocarpine Tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjogren syndrome: a randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. *Arch Intern Med*, 1999; 159:174-181.
- 18 - Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1993; 75:186-191.

- 19 - Bernardi R, Perin C, Becker FL, Ramos GZ, Gheno GZ, Lopes LR, Pires M, Barros HM. Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:105-110.
- 20 - Onofre MA, de Souza LB, Campos A Jr, Taga R. Stereological study of acinar growth in the rat parotid gland induced by isoproterenol. *Arch Oral Biol* 1997; 42:333-8.
- 21 - Olsson H, Spak CJ, Axell T. The effect of a chewing gum on salivary secretion, oral mucosal friction, and the feeling of dry mouth in xerostomic patients. *Acta Odontol Scand*, 1991; 49:273-9.
- 22 - Banderas-Tarabay JA, Gonzalez-Begne M, Sanchez-Garduno M, Millan-Cortez E, Lopez-Rodriguez A, Vilchis-Velazquez A. The flow and concentration of proteins in human whole saliva. *Salud Publica Mex*, 1997; 39:433-441.
- 23 - Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 1969; 26:235-302.
- 24 - Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol*, 1989; 13:879-99.
- 25 - Hunter KD, Wilson WS. The effects of antidepressant drugs on salivary flow and content of sodium and potassium ions in human parotid saliva. *Archs Oral Biol*, 1995; 40:983-989.
- 26 - Siepmann M, Grossmann J, Muck-Weymann M, Wilhelm Kirch. Effects of sertraline on autonomic and cognitive functions in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 2003; 168:293-298.
- 27 - Range HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. p.610-626.

- 28 - Schubert MM, Izutsu KT. Iatrogenic causes of salivary gland dysfunction. *J Dent Res*, 1987; 66:680-688.
- 29 - Grubb BP, Karas BJ. The potential role of serotonin in the pathogenesis of neurocardiogenic syncope and related autonomic disturbances. *J Interv Card Electrophysiol*, 1998; 2:325-332.
- 30 - Berne RM, Matthew NL, Koeppen BM, Staton BA. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- 31 - King MW. Neurotransmissores: diversidade e funções. Cérebro e mente [homepage da internet] 2004 [acesso em 10 Nov 2006]. Disponível em: <<http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves.html>>.
- 32 - Gould TD, Manji HK. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res*, 2002; 53:687-697.
- 33 - Walton MR, Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci*, 2000; 23:48-53.
- 34 - Ten Cate AR. Oral Histology: development, structure and function. 5. ed. St Louis: Mosby, 1998. p.98-110.
- 35 - Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia. Etiology, recognition and treatment. *JADA*, 2003; 134:61-69.
- 36 - Paykel ES. Handbook of affective disorders. 2. ed. New York: The Guilford Press, 1992.

Tabela 1 – Divisão dos grupos controle e experimentais de acordo com o fármaco, período de tratamento, dose e via de administração.

Grupo	Fármaco	Período de tratamento	Dose	Via de administração
1- controle positivo (P60)	Pilocarpina	1-60 dias	0,05 mL	tópica
2-experimental (FS)	Fluoxetina	1-30 dias	20 mg/kg	intraperitoneal
	Soro Fisiológico	31-60 dias	0,1 mL	intraperitoneal
3-experimental (VS)	Venlafaxina	1-30 dias	40 mg/kg	intraperitoneal
	Soro Fisiológico	31-60 dias	0,1 mL	intraperitoneal
4-experimental (F30)	Fluoxetina	1-30 dias	20 mg/kg	intraperitoneal
5- experimental (V30)	Venlafaxina	1-30 dias	40 mg/kg	intraperitoneal
6- experimental (VP)	Venlafaxina	1-60 dias	40 mg/kg	intraperitoneal
	Pilocarpina	31-60 dias	0,05 mL	tópica
7- experimental (FP)	Fluoxetina	1-60 dias	20 mg/kg	intraperitoneal
	Pilocarpina	31-60 dias	0,05 mL	tópica
8- controle (S60)	Soro Fisiológico	1-60 dias	0,1 mL	intraperitoneal
9- controle (S30)	Soro Fisiológico	1-30 dias	0,1 mL	intraperitoneal

FONTE: Dados da Pesquisa

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão das variáveis estudadas segundo os grupos tratados com soro fisiológico (1-30 dias), Fluoxetina (1-30 dias) e Venlafaxina (1-30 dias).

Grupos	9(S30)		4(F30)		5(V30)	
Variáveis	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T (mm)	7,036	0,506	9,501	1,404	8,696	1,409
M (mg)	0,075	0,010	0,103	0,032	0,064	0,018
VFS (mL/min)	0,051	0,025	0,013	0,006	0,026	0,022
VC (mm ³)	6965,683	3792,959	10384,305	4869,539	11945,905	7891,179

FONTE: Dados da Pesquisa

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das variáveis estudadas segundo os grupos em tratamento crônico com Pilocarpina (1-60 dias), soro fisiológico (1-60 dias), Fluoxetina (1-30 dias) e soro fisiológico (31-60 dias); Fluoxetina (1-60 dias) e Pilocarpina (31-60 dias).

Grupos	1(P60)		8(S60)		2(FS)		7(FP)	
Variáveis	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T (mm)	8,492	1,026	7,885	0,628	8,350	0,077	7,496	1,103
M (mg)	0,092	0,013	0,074	0,021	0,095	0,014	0,068	0,020
VFS (mL/min)	0,066	0,027	0,052	0,028	0,036	0,016	0,033	0,013
VC (mm ³)	5825,418	1968,070	6505,564	3343,475	6809,347	3189,246	7519,797	4272,808

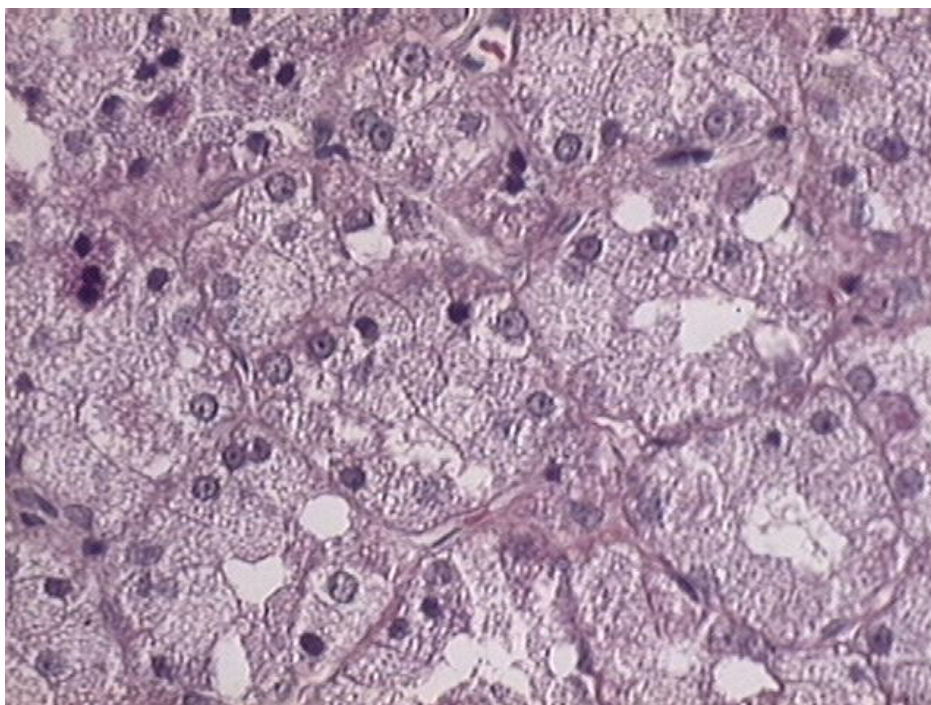
FONTE: Dados da pesquisa

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão das variáveis estudadas segundo os grupos em tratamento crônico com Pilocarpina (1-60 dias), soro fisiológico (1-60 dias), Venlafaxina (1-30 dias) e soro fisiológico (31-60 dias); Venlafaxina (1-60 dias) e Pilocarpina (31-60 dias).

Grupos	1(P60)		8(S60)		3(VS)		6(VP)	
Variáveis	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T (mm)	8,492	1,026	7,885	0,628	8,040	0,949	8,060	0,761
M (mg)	0,092	0,013	0,074	0,021	0,101	0,016	0,089	0,015
VFS (mL/min)	0,066	0,027	0,052	0,028	0,020	0,003	0,054	0,026
VC (mm ³)	5825,418	1968,070	6505,564	3343,475	7525,112	3196,085	10194,305	4456,345

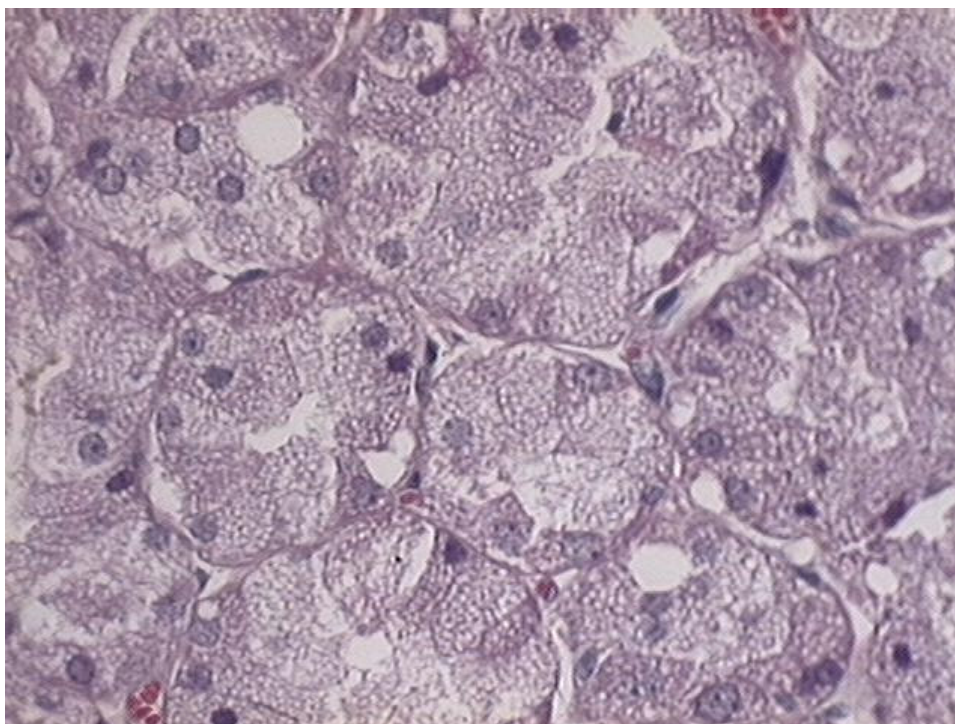
FONTE: Dados da pesquisa

Figura 1 – Aspecto histológico da glândula salivar do grupo F30 mostrando parênquima glandular desorganizado com diminuição do lume (H.E; aumento original de 400 X).



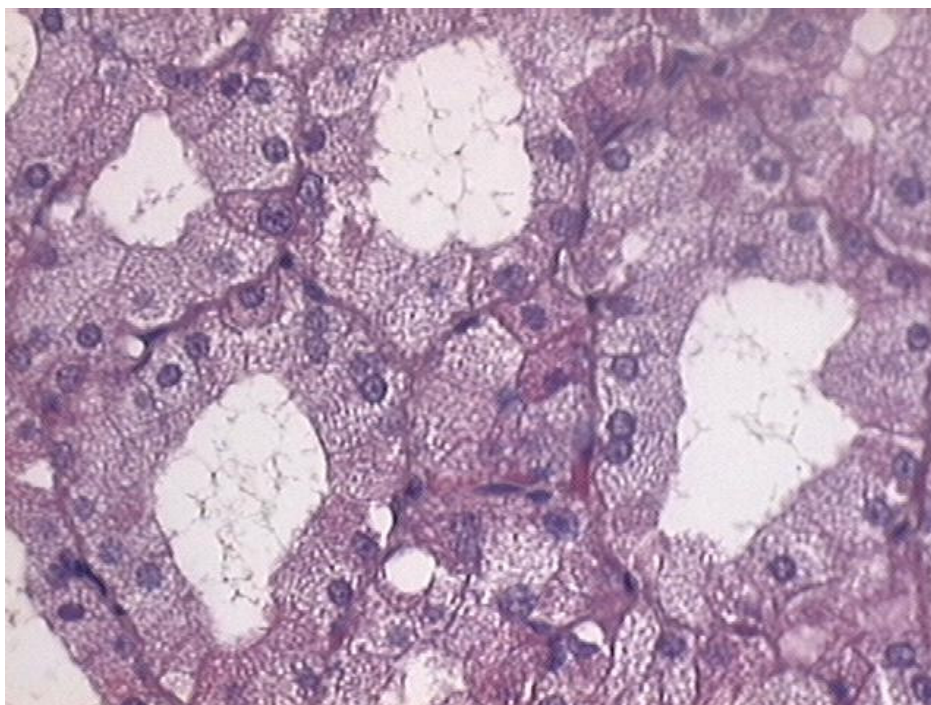
Fonte: Dados da Pesquisa

Figura 2 – Aspecto histológico da glândula salivar do grupo V30 mostrando diminuição do lume central das células serosas (H.E; aumento original de 400 X).



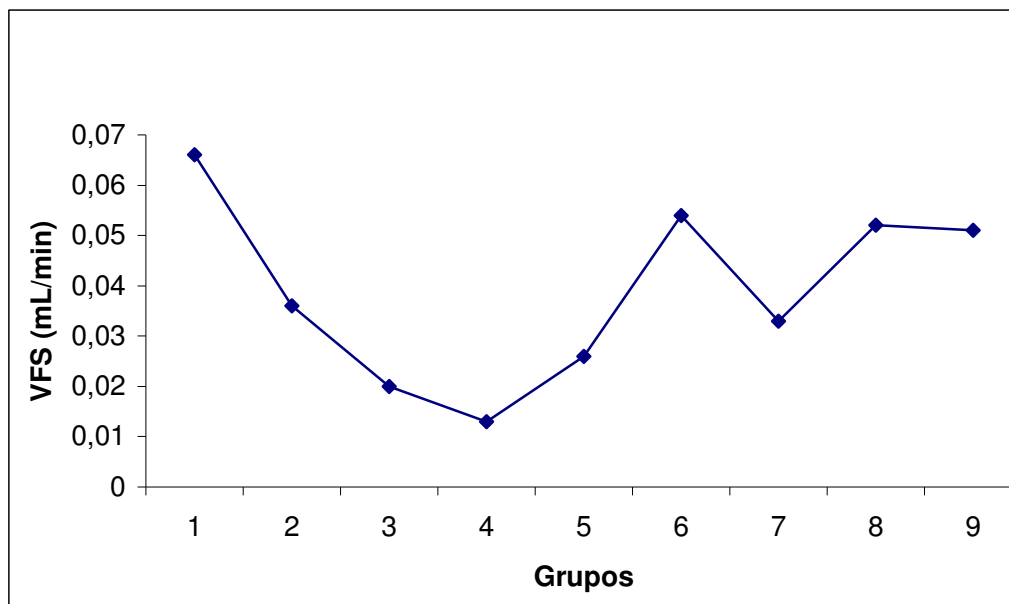
Fonte: Dados da Pesquisa

Figura 3 – Aspecto histológico da glândula salivar do grupo S30, mostrando células acinares bem delimitadas, circunscrevendo o lume acinar (H.E; aumento original de 400 X).



Fonte: Dados da Pesquisa

Gráfico 1 – Representação dos valores médios da variável VFS dos grupos



Fonte: Dados da Pesquisa

2 – ARTIGO EM INGLÊS

EFFECTS OF ANTIDEPRESSANTS (FLUOXETINE AND VENLAFAXINE) AND PILOCARPINE ON RAT PAROTID GLANDS

Silvana da Silva¹ Luciana Reis de Azevedo² Antônio Adilson Soares de Lima³ Sérgio
Aparecido Ignácio⁴ Ana Maria Trindade Grégio⁵ *

Pontifical Catholic University of Paraná

¹Post-Graduation Student, Department of Stomatology, School of Dentstry, Pontifical Catholic University of Paraná. Rua Frederico Maurer, 1948, Hauer 81670-020, Curitiba -Paraná – Brazil. E-mail: silvanaodonto@gmail.com

² Associate Professor, Departamene of Stomatology, School of Dentsrtry, Pontifical Catholic University of Paraná. Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba- Paraná – Brazil. E-mail: l.azevedo@pucpr.br

³Associate Professor, Department of Stomatology, School of Dentstry, Pontifical Catholic University of Paraná. Rua: Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba-Paraná- Brazil. E-mail: a.lima@pucpr.br

⁴ Associate Professor and Chairman, Department of Statistics, School of Dentstry, Pontifical Catholic University of Paraná. Rua: Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho80215-901, Curitiba-Paraná – Brazil. E-mail: sergioai@pucpr.br

⁵Associate Professor and Chairman, Department of Pharmacology, School of Dentstry, Pontifical Catholic University of Paraná. Rua Professor Luiz César 873 apto 202, Água Verde – 80.620-280, Curitiba- Paraná- Brazil. E-mail: ana.gregio@pucpr.br

*Corresponding author: Phone: 55(41) 3243-4541. Fax: 55(41)3271-1405. E-mail: ana.gregio@pucpr.br

Abstract

This study assessed the effect of the antidepressants, Fluoxetine and Venlafaxine, on the size (GS), mass (M), cellular volume (CV), of rat parotid salivary glands and salivary flow rate (SFR), as well as the secretagogue action of pilocarpine on this flow. Ninety animals were divided into 9 treatment groups with the antidepressants, antidepressants associated with the application of pilocarpine, antidepressants and physiologic serum, physiologic serum (control) and pilocarpine (positive control). Thirty hours after the end of treatment, saliva collection began, to determine the SFR. Next, the salivary glands were removed, GS and M measured, and the specimens processed for histomorphometric analysis and CV determination. The variable GS presented statistically significant increase among the groups that were treated for 30 days with Fluoxetine ($p=0.0002$) and Venlafaxine ($p=0.0112$) when compared with the group treated with physiologic serum (control). The group treated with Fluoxetine for 30 days revealed increase in M ($p=0.0190$) and diminished SFR ($p=0.0031$), statistically significant, when compared with the control group. CV revealed increase in acinic cells between the Fluoxetine (30 days) ($p=0.0005$) and Venlafaxine (30 days) ($p=0.0004$) groups as well, when compared with the control group. The group treated with Venlafaxine for 60 days in association with pilocarpine presented SFR similar to the control group treated for 60 days. Both Fluoxetine and Venlafaxine reduced the SFR and caused increase in CV, resulting in hypertrophy of the glands, with Fluoxetine having a more pronounced anticholinergic action. The pilocarpine increased the SFR in the group that received Venlafaxine.

Keywords: Antidepressants. Xerostomia. Hiposalivation.

Introduction

Normal salivation is an essential demand for oral health, due to its important contributions to the oral defense mechanisms. Diminished salivary secretion could lead to caries disease and deterioration of the mucosa¹⁻³.

Salivary secretion is neurologically controlled by stimulation of reflex action. The salivary glands are enervated by the sympathetic and parasympathetic autonomic nervous system (ANS). Sympathetic enervation is linked by means of the type α_2 and β_2 adrenergic receptors⁴, while parasympathetic enervation is linked to the muscarinic receptor M3. The primary acinar content is modified as it passes through the system of salivary gland ducts. This process occurs because the cells of the duct receive stimulus from the sympathetic and parasympathetic pathways⁵.

Depression is the commonest form of affective disorders, and may range from discrete to severe. Various studies have worked with the hypothesis that depression arises from the deficiency of monoamines (noradrenaline, serotonin and dopamine), the most adequate treatment being to raise the supply of these neurotransmitters in the central nervous system (CNS). Statistical data have shown that depression has increased as a result of the longer life expectancy, and is common among the elderly population⁶.

The treatment of psychiatric disorders and affective disturbances mainly involves antidepressant, antipsychotic and anxiolytic drugs. Studies relate that patients with psychiatric alterations that make use of these drugs complain of dry mouth⁷. Depressive alterations accompanied by the symptom of dry mouth are 20% more frequent in women than in men⁸. The most affected age group ranges from 30 years to 59 years⁵.

Antidepressants have an affinity for the adrenergic and cholinergic receptors present in the salivary glands, and present an anticholinergic effect. The action of antidepressant drugs may be related to this affinity, and the reduction of the cholinergic and sympathetic influx to the CNS. The main side effect of these drugs is inhibition of the secretagogue effect caused by cholinergic stimulation, thus causing hyposalivation⁹. Other side effects include: nausea, dizziness, somnolence, sweating and tremors¹⁰.

Fluoxetine is a selective serotonin reuptake inhibitor (SRI) and among others of the same class, is the result of research to find medications as effective as the tricyclic medications, but with few tolerability and safety problems. This drug does not inhibit the reuptake of other neurotransmitters, having no affinity for the adrenergic, muscarinic, cholinergic, H₁-histaminic or dopaminic receptors¹¹. Although they are considered safe drugs and present easily attainable therapeutic doses, the SRIs present significant side effects, such as: nausea, diarrhea, diminished, headaches, insomnia and xerostomia¹².

Venlafaxine is an antidepressant drug with a completely different chemical structure from that of other antidepressant agents. Its action mechanism resembles that of other known antidepressant, such as: fluoxetine, sertraline and paroxetine, since it is directly associated with potentiating neurotransmitter activity in the CNS^{13,14}.

This drug is presented as a selective serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor, and presents weak activity as dopamine reuptake inhibitor, clinically significant only at high doses¹¹. It does not present affinity for adrenergic receptors α_1 , and muscarinic or histaminic receptors^{11,15}. Consequently, it is less likely to produce side effects related to these pharmacologic properties¹⁶.

Various treatments are proposed for enhanced salivary secretion, among them is the use of a salivary flow stimulating drug, pilocarpine chloride, a sialogogue drug that acts by stimulating the parasympathetic ANS¹⁷. This drug has been used because it stimulates the cholinergic receptors, among them the muscarinic M3 receptor present in the salivary glands, resulting in the expulsion of the stored salivary contents¹⁸, thus an increase in saliva production and release is observed with the use of pilocarpine¹⁹.

The aim of the present study was to verify the action of two drugs in the antidepressant class, Fluoxetine and Venlafaxine on the salivary flow rate, as well as to make a histomorphometric analysis of the rat parotid glands submitted to chronic treatment with such drugs, and to assess the secretagogue action of pilocarpine on this flow.

Material and Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee of Tuiuti University of Paraná, under the registration number CEP-UTP 55/2003.

The animal model enrolled in this investigation consisted of male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar strain) obtained from the Central Animal Facility of the Pontifical Catholic University of Paraná. The animals were, weighed approximately 250g, and were maintained in cages with water and food *ad libidum*, on a light/dark cycle of 12 hours.

Ninety animals, divided in nine groups had been used, each group consisting of 10 animals (Table 1). The experimental groups had received two antidepressant drugs, injectable solution of Fluoxetine (lot 20040625, GalenaQuímica e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brazil) and Venlafaxine (lot D/VN/002/02, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brazil). Controlled Groups S30 and S60

had received solution injectable from physiological serum and the P60 group received gel base prepared with 1% from pilocarpine hydrochloride (Gerbras Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brazil).

Sialometry

According to described methodology for Onofre et al.²⁰, saliva samples were collected 30 hours after the end of treatment. The animals had received two drops of 4% pilocarpine hydrochloride eye drops (Allergan pilocarpina® 4%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., Guarulhos, Brazil), to stimulate the salivation. After one minute, saliva were collected in a collecting pot that was weighed in scale of high precision - Belmark® U210A (Bel Engenharia, Piracicaba, Brazil), getting in such a way the salivary flow rate (SFR).

The values of amount of saliva had been gotten in accordance with the described formula below^{21,22}:

$$\frac{\text{WEIGHT OF POT AFTER COLLECTION (g)} - \text{WEIGHT OF POT BEFORE COLLECTION (g)}}{\text{TIME (1min)}} = \frac{\text{WEIGHT SALIVA}}{\text{TIME (1min)}} = \text{SALIVARY FLOW RATE (mL/min)}$$

Parotidian gland exsiccation and size measurement

Glands were obtained from each group right after the saliva collection. Rats were weighted and anaesthetised by intraperitoneal administration of 100 mg/kg sodium thiopental (Thionembutal®, Abbott Laboratórios do Brazil Ltda.) and killed.

The right and left parotid glands were dissected and were carefully removed. Fresh gland masses were determined with a BelMark® U210A precision scale. After this, the millimetric longitudinal dimensions were achieved using a high-precision digital calliper Mitutoyo 500 Mical® (Mitutoyo Co., Tokyo, Japan). The average of the

glands size and the glands mass was carried through, for attainment of variable so size (GS) and mass (M) for each rat. After the measurement of the part, gland tissue had been fixed in 10% neutral formalin solution and embedded in paraffin. Four μm sections were obtained and submitted for routine hematoxylin-eosin (in accordance with the routine of the Laboratory of Experimental Pathology of the PUCPR).

On microscope examination were used microscopy Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan), using objective of 40X and 100X (oil immersion). The images had been captured with digital camera Sony® CCD-IRIS DXC-107A (Sony Eletronics Incorporation, Tokyo, Japan) connected to the microscope and a microcomputer. With a program for analysis of images (Image-Pro® Plus, Cybernetics, Silverspring, U.S.A.), the histological analysis front to the use of antidepressants and the pilocarpine was evaluated.

Histomorphometry of parotid glands

To establish the comparisons among the groups, with regard to the cellular volume (CV), the variable presented had been used in the study of Onofre et al. (1997).

Processed gland volume (v_p) was calculated for each animal using the following equation $V_p = m / d \times rf$, where m is fresh mass, d is density and rf is the shrinkage caused by histological processing. For these calculations, we used $d = 1.089 \text{ g/cm}^3$ and $rf = 0.7$ by the method of Onofre et al. (1997).

For the stereological evaluation of acinar volume density (V_{vi}) and total volume (V_{ti}) it was used an objective of 40X connected to the program Image-Pro® Plus, where if it got a vertical grating with ten horizontal lines and ten lines, determining one hundred points of which forty had been chosen to perhaps. In these forty chosen points had been counted how many points coincided with acini (P_i). The

V_{vi} by means of the formula was calculated then: $V_{vi}=P_i/P_t$, where P_t mentions the number to it of selected points (40).

Having obtained the V_{vi} and processed gland volume (V_p) values, we calculated the total acinar volume (V_{ti}) by the formula $V_{ti} = V_{vi} \times V_p$. Nuclear volume was determined from the measurement of the orthogonal diameters of 50 nuclei per gland using a microscopy technique as stated before. We calculated the mean radius of the geometric mean diameter by $r^2 = d_1 \times d_2$ and the nuclear volume by the formula for the volume of a sphere: $V=4/3 \times \pi \times r^3$.

The cytoplasmic volume was calculated as of the nucleus densities and the cytoplasm of acinar cells²³. In this respect, it was counted the points over nuclei (P_n) and over the cytoplasm (P_{cyti}) in 40 histological fields of the cells under study. The corrected nuclear volume density (p_{ncorr}) was calculated by the equation $p_{ncorr} = (P_n/P_n+P_{cyti})/K_o$, where K_o is the correction factor and it is calculated by the formula $K_o = 1+3t/2d$, where d is the mean nuclear diameter and t is section thickness.

The corrected cytoplasm volume density is $p_{cyticorr} = 1 - p_{ncorr}$. By dividing $p_{cyticorr}$ by p_{ncorr} it was obtained the cytoplasm/nucleus ratio (RC/N) of the acinar cells. On the basis of nuclear volume (V_{ni}) and the C/N ratio, it was calculated the cytoplasmic volume (V_{cyti}) by the equation $V_{cyti} = V_{ni} \times RC/N$. This then permitted to calculate the cell volume by $V_c = V_{ni} + V_{cyti}$.

Statistical Analysis

To rest the presupposition of normality of the variables for each group, the Komolgorov-Smirnov test was used. The Levene test verified the homogeneity of the variances among the groups.

When the analysis of variance Anova found differences among the means of the groups and treatments, the Tukey HSD multiple comparisons test was used for

the variables that presented homogeneity of variances among the groups. For the variables that did not present homogeneity of variances among the groups, the Games-Howell test was used.

For all the tests the level of significance of 5% ($p < 0.05$) was applied.

Results

All the groups presented normality of distribution of the data for the variables GS, M, SFR and CV of the studied glands ($p > 0.05$), with exception of the variable SFR in the group S60, the variable GS in groups FS and S30, and the variable M in the group F30.

The variables GS and M showed homogeneity of variance ($p > 0.05$) and the variables SFR and CV did not present homogeneity of variance ($p < 0.05$).

The sample was divided into groups of chronic treatment for periods of 30 and 60 days in accordance with the medication and associations used, described in Table 1.

Groups treated for 30 days

Table 2 shows the means and standard deviations of the studied variables in accordance with the groups treated for 30 days.

There was statistically significant difference between the means of the variable GS among the following groups: F30 ($p = 0.0002$), V30 ($p = 0.0112$), when compared with group S30 (control).

For the variable M, there was statistically significant difference for the following groups: F30 and V30 ($p = 0.0011$), F30 and S30 ($p = 0.0190$), the highest mean being found for the group F30 and the lowest mean for the group V30.

The variable SFR (Figure 1), presented statistically significant difference between groups: F30 and S30 ($p = 0.0031$).

There was statistically significant difference for the variable CV between the following groups: F30 (Figure 2) and S30 ($p=0.0005$), V30 and S30($p=0.0004$).

Figures 3 and 4 show rat parotid glands from groups V30 and S30, respectively.

Groups treated for 60 days

Tables 3 and 4 show the means and standard deviations of the studied variables in accordance with the groups treated for 60 days.

The variable GS did not show statistically significant differences among the groups. Group P60 presented the highest mean and group FP the lowest mean among the groups.

There were statistically significant differences for the variable M between groups P60 and FP ($p=0.0351$), FS and FP ($p=0.0161$), VS and FP ($p=0.0015$), VS and S60 ($p=0.0132$).

For SFR, there were statistically significant differences between the following groups: P60 and VS ($p=0.0047$), P60 and FP ($p=0.0451$), VS and VP ($p=0.0214$).

The variable CV showed statistically significant differences between groups P60 and VS ($p=0.0231$), P60 and VP ($p=0.000003$), FS and VP ($p=0.0005$); VS and VP ($p=0.0111$), VP and FP ($p=0.0327$), VP and S60 ($p=0.0001$). Group P60 obtained the lowest mean and group VP the highest mean.

Discussion

The anticholinergic effects of drugs that act on the CNS have not yet been completely explained. The majority of authors opt for defining the autonomic capacity of these drugs in linking to the adrenergic and cholinergic receptors, altering the quality and quantity of salivary flow. But several other factors must be considered, because in addition to interaction with and affinity to the sympathetic and

parasympathetic CNS and ANS, other neurotransmitters, proteins and amino acids are capable of resulting in alteration of activity in the salivary glands⁵.

This study observed that Fluoxetine (F30) produced increase in GS and M of the rat parotid salivary glands, in addition to increasing CV in comparison with the control group S30. This effect probably occurred because the drugs with central action promote an action of salivary gland hypertrophy⁹. This result corroborates those of Madrigal and Micheau²⁴, who characterized hypertrophy of the glands by widening of the acini and accumulation of secretion granules, cause by drugs with central action.

The anticholinergic action of psychotropic drugs^{24,5} was proved once again, because in the group treated with Fluoxetine for 30 days (F30), the animals' SFR was lower in comparison with the control group (S30), thus justifying the increase in GS and M, as there was retention of saliva in the acini lumen and little of it being released.

The antidepressants SRIs when compared to the tricyclic drugs have not presented significant effect in the flow rate, probably due to lack of anticholinergic activity^{25,26}. The flow reduction could occur through the serotonin receptor action presented at the peripheral microcirculation²⁷. According to Schubert and Izutsu²⁸, the salivary flow can be effected by drugs through alteration at the blood flow of the salivary glands. For Grubb and Karas²⁹, the serotonin has important physiology participation at the autonomic regulation, since, one time CNS controls the sympathetic, the parasympathetic and the serotonin mechanisms, probably one decrease or activation of the release of serotonin at the CNS would result of the alteration of both sympathetic and parasympathetic. These hypothesis contribute with our finds regarding the reduction of the SFR caused by Fluoxetine.

The uncertainty as regards the exact biochemical action mode of antidepressants frequently causes the development of new drugs to be empirical. This led to the introduction of a heterogeneous group of compounds (to which Venlafaxine belongs), the atypical antidepressants. In practice, the most recent drugs may definitively be superior to the tricyclic drugs in terms of side effects and acute toxicity, but they have not been shown to have a faster action or be more effective^{11,26,27}.

With regard to the results obtained by Venlafaxine (V30) both GS and CV had higher values in comparison with the control group, and in addition there was diminished SFR when compared with the control (S30), once again demonstrating the anticholinergic action of psychotropic drugs and the effect of acinar cell hypertrophy^{9,24}.

Venlafaxine has fewer anticholinergic and adrenergic α -blocker effects than the other antidepressive¹⁶. This would cause a reduction in the adverse effects, because at low doses, this drug predominantly blocks serotonin and noradrenalin reuptake, and at high doses also inhibits dopamine reuptake. This hypothesis reinforces the great expectation in the use of Venlafaxine in comparison with Fluoxetine, and is in agreement with the present study findings, since the value of SFR for Venlafaxine (V30) was higher when compared with the SFR value for Fluoxetine (F30). Furthermore, fluoxetine has metabolite of prolonged action and pharmacologically active¹¹.

The acinar cells present adrenergic α and β receptors, vasoactive intestinal peptide receptors (VIP), acetylcholine and P substance. The receptors for β adrenergic and for VIP, activate the cyclic AMP cascade, activating the G protein, which activates the adenylate cyclase enzyme. Whereas the α adrenergic receptors

and the receptors for acetylcholine and P substance activate the inositol 1, 4, 5 triphosphate cascade (IP3) and of diacylglycerol. These biochemical reaction and interaction sequences influence both salivary secretion and composition³⁰.

Because Venlafaxine is a weak serotonin and noradrenalin reuptake inhibitor, it has fewer side effects than Fluoxetine²⁷. Another hypothesis for justifying, besides the others mentioned before, this is that the majority of types of serotonergic receptors are coupled to the G proteins, affecting adenylate cyclase activity³¹. This enzyme, in turn, converts ATP into the second messenger, cyclic AMP³² which, as central effect, presents activation of the protein kinase A (PKA), an enzyme that regulates ionic channels, which are responsible for the entry and exit of water and electrolytes from cells³³.

On the other hand, the CV of rat parotid glands in the group treated with Venlafaxine (V30) was greater than in the group treated with Fluoxetine (F30). This is probably owing to the fact that Venlafaxine, because it also inhibits noradrenalin reuptake, and this being the mediator of the sympathetic ANS, which in turn tends to modulate the composition of saliva, inducing the protein secretion mechanism^{30,34}, which may be accumulating inside the salivary gland, resulting in cellular hypertrophy.

In the present study, the secretagogue role of pilocarpine was observed, since the group of animals that received pilocarpine for 60 days showed the highest mean SFR value, when compared with group S60, that is, pilocarpine activates the muscarinic M3 receptors present in the salivary gland, which promote increased release of salivary secretion³⁵.

For Fluoxetine, the group treated for 30 days and then treated for a further 30 days with association of pilocarpine (FP) had a lower SFR than that of group S60.

The group treated with Venlafaxine for 30 days and then treated for a further 30 days with association of pilocarpine (VP) had a similar SFR to that of group S60. In this case, pilocarpine was able to restore the SFR to levels of control, corroborating the secretagogic action of pilocarpine in the treatment of hyposalivation caused by Venlafaxine.

The groups FS and VS presented lower SFR values than the group S60, proving that after suspension of the drug, withdrawal symptoms may occur, which appear within one to ten days and persist for up to three or four weeks. The most frequent symptoms are dizziness, vertigo, ataxia, gastrointestinal disorders, flu symptoms, sensorial disturbances, sleep alterations, psychic alterations and anticholinergic effects. As happens with other psychoactive substances, these symptoms may be the result of adaptive alterations, which most frequently involve the adjustment of the receptors to compensate the pharmacological activity of the drug, described as a rebound effect¹¹.

The advance of research in the psychopharmacology of antidepressives has offered patients drugs with very different pharmacokinetic profiles among them. In spite of this, the action mechanisms proposed for each of them remain linked to monoaminergic theories of increased offer of neurotransmitters in the synaptic gap and the subsensitization of presynaptic receptors³⁶.

In terms of the number of drugs available, there has been a considerable enlargement of the therapeutic arsenal, both with expansion in the number of compounds of the same pharmacological group, and in the appearance of drugs with different action profiles from those of the original ones. The more recent compounds are more selective, leading to greater tolerability and adherence to treatment¹¹.

One verifies an effort in the sense of increasingly improving the action in receptor sites determinant of clinical efficacy, avoiding those responsible for side effects²⁵. However, new inquiries become necessary due the complexity of the involved events in the salivar secretion mechanism.

Conclusions

It could be concluded that both Fluoxetine and Venlafaxine reduced the SFR and caused hypertrophy of the rat parotid gland, with Fluoxetine having a more pronounced anticholinergic action. Pilocarpine contributed to increasing SFR, mainly in the groups that received Venlafaxine, suggesting the use of pilocarpine for the treatment of hyposalivation caused by this drug.

Acknowledgements

The authors thank the biologist Ana Paula Camargo Martins – technician responsible for the Experimental Pathology Laboratory at PUCPR, the staff of the Central Vivarium at PUCPR (especially the veterinary doctor Indalécio Mainardes Sutil) and the scientific initiation students of PUCPR (PIBIC) Miriam Vanessa Zaclikevis and Anna Clara Duszczak D'Agulham for the valuable contribution towards concluding this work.

References

- 1 - Mandel ID, Wotman S. The salivary secretions in health and disease. *Oral Sci Rev* 1976; 8:25-47.
- 2 - Mandel ID. Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1980; 12:321-366.
- 3 - Narhi TO. Prevalence of subjective feelings of dry mouth in the elderly. *J Dent Res* 1994; 73:20-25.
- 4 - Baum BJ. Neurotransmitter control of salivation. *J Dent Res* 1987;66:628-632.
- 5 - Scully CBE. Drugs effects on salivary glands: dry mouth. *Oral diseases* 2003; 9:165-176.
- 6 - Glassman AH, Carino JS, Roose SP. Adverse effects of tricyclic antidepressants: focus on the elderly. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1984; 39: 391-398.
- 7 - Thomsom WM, Chalmers JM, Spencer AJ, Slade GD. Medication and dry mouth: findings from a cohort study of older people. *J Public Health Dent* 2000; 60:12-20.
- 8 - Bogetto F, Maina G, Ferro G, Carbone M, Gandolfo S. Psychiatric comorbidity in patients with burning mouth syndrome. *Psychosomatic Med* 1998; 60: 378-385.
- 9 - Grégio AMT, Durscki JRC, Lima AAS, Machado MAN, Ignácio SA, Azevedo LR. Association of amitriptyline and Diazepam on histomorphometry of rat parotid glands. *Pharmacologyonline* 2006; 2:96-108.
- 10 - Horst WD, Preskorn SH. Mechanism of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. *J Affective Disord* 1998; 51:237-254.

- 11 - Moreno RA, Moreno DH, Soares MBM. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev Bras Psiquiatr* 1999; 21: 24-40.
- 12 - Goldstein BJ, Goodnick PJ. SSRIs in the treatment of affective disorders III. Tolerability, safety and pharmacoeconomics. *J Clin Psychopharmacol* 1998; 12:55-88.
- 13 - Ballone GJ. Psiqu Web/: antidepressivos atípicos GJ Ballone [homepage da internet]. [Atualizado em 15 de maio de 2005; Acesso em 26 de novembro de 2006]. Disponível em: <www.psiqweb.med.br>
- 14 - Almeida RN. *Psicofarmacologia – fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.25-45.
- 15 - Diaz-Martinez A, Benassinni O, Ontiveros A, Gonzalez S, Salin R, Basquedano G, Martinez RA. A randomized, open-label comparison of venlafaxine and fluoxetine in depressed outpatients. *Clin Ther* 1998; 20:467-476.
- 16 - Denys D, van der Wee N, van Megen HJ, Westenberg HG. A double blind comparison of venlafaxine and paroxetine in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychopharmacol*, 2003; 23:568-575.
- 17 - Vivino FB, Al-Hasshimi I, Khan Z, Leveque FG, Salisbury PL 3rd, Tran-Johnson TK, Muscoplat CC, Trivedi M, Goldlust B, Gallagher SC. Pilocarpine Tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjogren syndrome: a randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. P92-01 Study Group. *Arch Intern Med*, 1999; 159:174-181.
- 18 - Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1993; 75:186-191.

- 19 - Bernardi R, Perin C, Becker FL, Ramos GZ, Gheno GZ, Lopes LR, Pires M, Barros HM. Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:105-110.
- 20 - Onofre MA, de Souza LB, Campos A Jr, Taga R. Stereological study of acinar growth in the rat parotid gland induced by isoproterenol. *Arch Oral Biol* 1997; 42:333-8.
- 21 - Olsson H, Spak CJ, Axell T. The effect of a chewing gum on salivary secretion, oral mucosal friction, and the feeling of dry mouth in xerostomic patients. *Acta Odontol Scand*, 1991; 49:273-9.
- 22 - Banderas-Tarabay JA, Gonzalez-Begne M, Sanchez-Garduno M, Millan-Cortez E, Lopez-Rodriguez A, Vilchis-Velazquez A. The flow and concentration of proteins in human whole saliva. *Salud Publica Mex*, 1997; 39:433-441.
- 23 - Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol*, 1969; 26:235-302.
- 24 - Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol*, 1989; 13:879-99.
- 25 - Hunter KD, Wilson WS. The effects of antidepressant drugs on salivary flow and content of sodium and potassium ions in human parotid saliva. *Archs Oral Biol*, 1995; 40:983-989.
- 26 - Siepmann M, Grossmann J, Muck-Weymann M, Wilhelm Kirch. Effects of sertraline on autonomic and cognitive functions in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 2003; 168:293-298.
- 27 - Range HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. p.610-626.

- 28 - Schubert MM, Izutsu KT. Iatrogenic causes of salivary gland dysfunction. *J Dent Res*, 1987; 66:680-688.
- 29 - Grubb BP, Karas BJ. The potential role of serotonin in the pathogenesis of neurocardiogenic syncope and related autonomic disturbances. *J Interv Card Electrophysiol*, 1998; 2:325-332.
- 30 - Berne RM, Matthew NL, Koeppen BM, Staton BA. *Fisiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- 31 - King MW. Neurotransmissores: diversidade e funções. Cérebro e mente [homepage da internet] 2004 [acesso em 10 Nov 2006]. Disponível em: <<http://www.cerebromente.org.br/n12/fundamentos/neurotransmissores/nerves.html>>
- 32 - Gould TD, Manji HK. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res*, 2002; 53:687-697.
- 33 - Walton MR, Dragunow I. Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci*, 2000; 23:48-53.
- 34 - Ten Cate AR. Oral Histology: development, structure and function. 5. ed. St Louis: Mosby, 1998. p.98-110.
- 35 - Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia. Etiology, recognition and treatment. *JADA*, 2003; 134:61-69.
- 36 - Paykel ES. Handbook of affective disorders. 2. ed. New York: The Guilford Press, 1992.

Table 1 – Controls and experimental groups in accordance the drug, treatment time, dose and administration.

Group	Drug	Treatment time	Dose	Administration
1- positive control (P60)	Pilocarpine	1-60 days	0,05 mL	topic
2-experimental (FS)	Fluoxetine	1-30 days	20 mg/kg	intraperitoneal
	Physiological Serum	31-60 days	0,1 mL	intraperitoneal
3-experimental (VS)	Venlafaxine	1-30 days	40 mg/kg	intraperitoneal
	Physiological Serum	31-60 days	0,1 mL	intraperitoneal
4-experimental (F30)	Fluoxetine	1-30 days	20 mg/kg	intraperitoneal
5- experimental (V30)	Venlafaxine	1-30 days	40 mg/kg	intraperitoneal
6- experimental (VP)	Venlafaxine	1-60 days	40 mg/kg	intraperitoneal
	Pilocarpine	31-60 days	0,05 mL	topic
7- experimental (FP)	Fluoxetine	1-60 days	20 mg/kg	intraperitoneal
	Pilocarpine	31-60 days	0,05 mL	topic
8- control (S60)	Physiological Serum	1-60 days	0,1 mL	intraperitoneal
9- control (S30)	Physiological Serum	1-30 days	0,1 mL	intraperitoneal

SOURCE: Data of research

Table 2 – Values of studied variables in accordance with groups treated with physiological serum (1-30 days), Fluoxetine (1-30 days) and Venlafaxine (1-30 days).

Groups	9(S30)		4(F30)		5(V30)	
Variables	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Gland size (mm)	7,036	0,506	9,501	1,404	8,696	1,409
Mass (mg)	0,075	0,010	0,103	0,032	0,064	0,018
Salivary flow rate						
(mL/min)	0,051	0,025	0,013	0,006	0,026	0,022
Volume of cells						
(mm ³)	6965,683	3792,959	10384,305	4869,539	11945,905	7891,179

SOURCE: Data of research

Table 3 – Values of studied variables in accordance with groups treated with Pilocarpine (60 days), physiological serum (60 days), Fluoxetine (30 days) + physiological serum (31-60 days), Fluoxetine (1-60 days) + de Pilocarpine (31-60 days).

Groups	1(P60)		8(S60)		2(FS)		7(FP)	
Variables	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Gland size (mm)	8,492	1,026	7,885	0,628	8,350	0,077	7,496	1,103
Mass (mg)	0,092	0,013	0,074	0,021	0,095	0,014	0,068	0,020
Salivary flow rate								
(mL/min)	0,066	0,027	0,052	0,028	0,036	0,016	0,033	0,013
Volume of cells								
(mm ³)	5825,418	1968,070	6505,564	3343,475	6809,347	3189,246	7519,797	4272,808

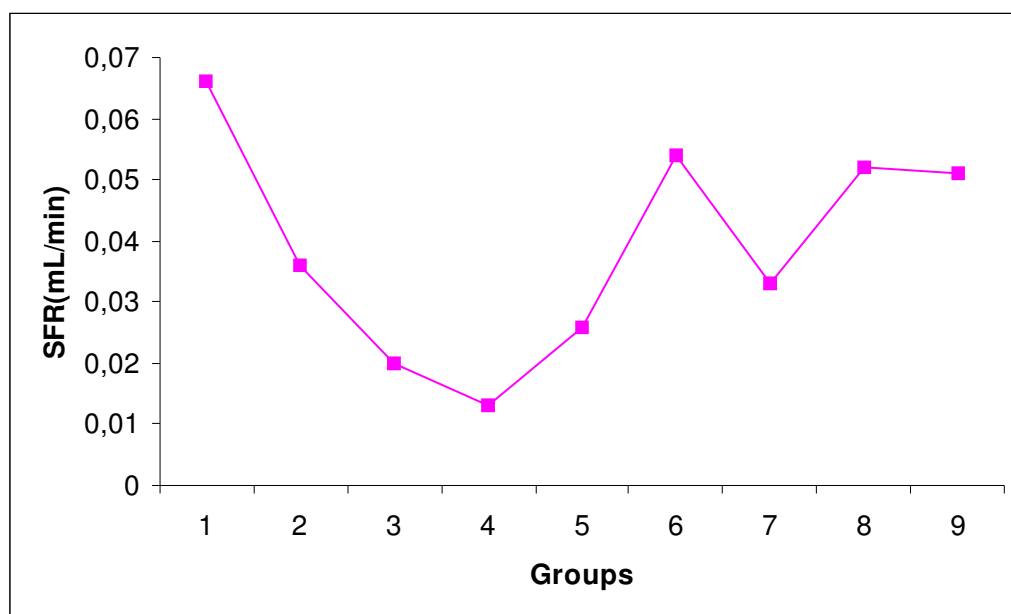
SOURCE:: Data of research

Table 4 - Values of studied variables in accordance with groups treated with Pilocarpine (60 days), physiological serum (60 days), Venlafaxine (30 days) + physiological serum (31-60 days), Venlafaxine (1-60 days) + de Pilocarpine (31-60 days).

Groups	1(P60)		8(S60)		3(VS)		6(VP)	
Variables	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Gland size (mm)	8,492	1,026	7,885	0,628	8,040	0,949	8,060	0,761
Mass (mg)	0,092	0,013	0,074	0,021	0,101	0,016	0,089	0,015
Salivary flow rate								
(mL/min)	0,066	0,027	0,052	0,028	0,020	0,003	0,054	0,026
Volume of cells								
(mm ³)	5825,418	1968,070	6505,564	3343,475	7525,112	3196,085	10194,305	4456,345

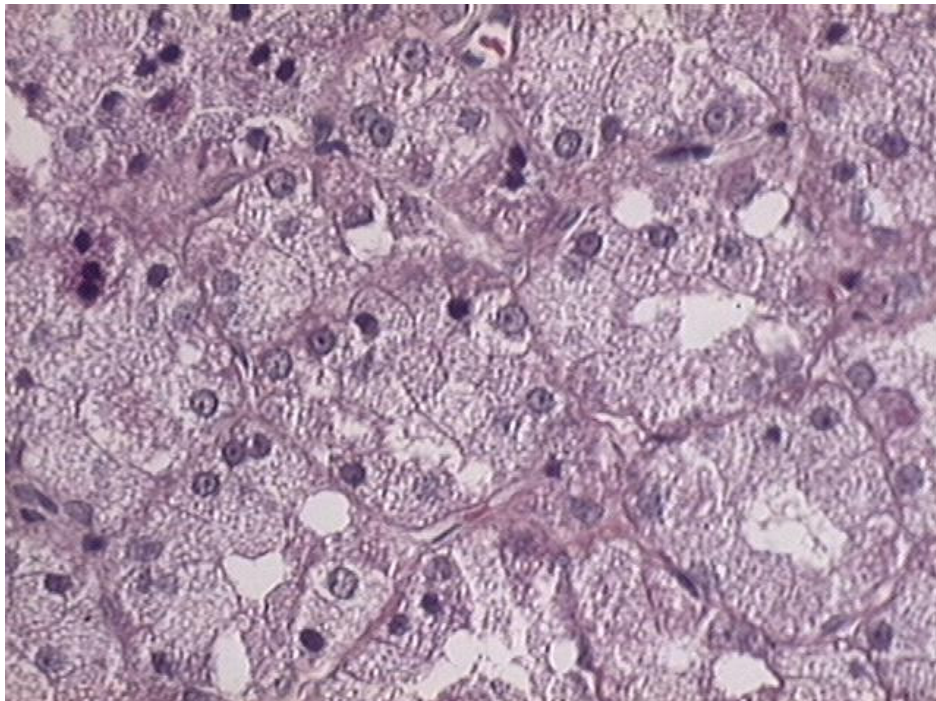
SOURCE: Data of research

Figure 1 - Values of variable SFR in accordance with controls and experimental groups.



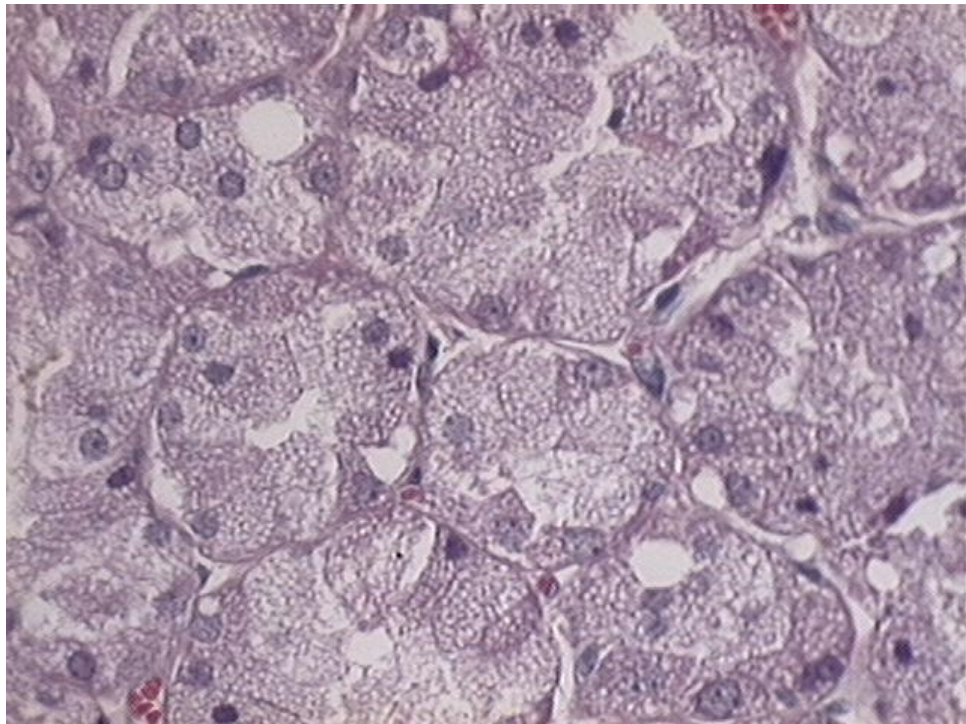
SOURCE: Data of research

Figure 2 - Histologic aspect of the salivary gland of the F30 group being show disorganized glandular parenchyma with reduction of the central lume (H.E.; original magnification: 400X).



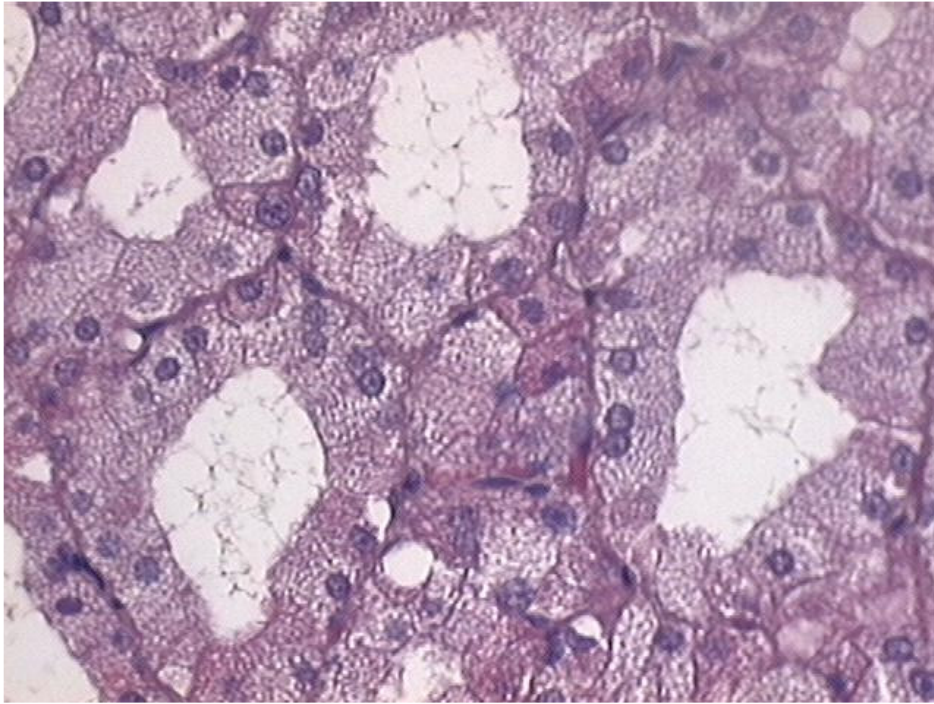
SOURCE: Data of research

Figure 3 - Histologic aspect of the salivary gland of the V30 group being show reduction of the central lume of serous cells (H.E.; original magnification: 400X).



SOURCE: Data of research

Figure 4 - (Group S30) Well-structured glandular parenchyma divided into lobes by the connective tissue septa (H.E.; original magnification: 400X).



SOURCE: Data of research

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade
Tuiuti
do Paraná

PROPPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO,
PESQUISA E EXTENSÃO

Curitiba, 26 de agosto de 2003

Of. CEP-UTP n.º 55 /2003

Sra. Pesquisadora

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tuiuti do Paraná, CEP-UTP, após apreciação do Projeto de Pesquisa, de sua autoria, intitulado "**Efeito do pilocarpus jaborandi sobre a xerostomia induzida por drogas psicotrópicas**" considerou-o **APROVADO**.

Prof.^a Dr.^a **BEATRIZ HELENA SOTTILE FRANÇA**
Coordenadora do CEP-UTP

Ilmo. Sra.
Ana Maria Trindade Grégio
Pesquisadora Responsável

ANEXO B – MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em animais da Universidade Tuiuti do Paraná (CEP-UTP nº 55/2003).

Amostra

Foram utilizados 90 ratos machos do tipo *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia, mammalia* da linhagem *Wistar* (oriundos do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná), com peso aproximado de 250g, que foram mantidos em gaiolas plásticas com água e comida *ad libidum*, respeitando o fotoperíodo de doze horas, e aclimatados ao ambiente laboratorial.

Os animais foram divididos em 9 grupos, cada grupo constituído por 10 animais (Tabela1). Os grupos experimentais receberam dois fármacos antidepressivos, solução injetável de Fluoxetina (lote 20040625, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil) e Venlafaxina (lote D/VN/002/02, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil) diariamente. Os grupos controle S30 e S60 receberam solução injetável de soro fisiológico e o grupo P60 recebeu gel em ora base preparado com 1% de hidrocloreto de pilocarpina (Gerbras Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil).

Tabela 1 – Divisão dos grupos controle e experimentais de acordo com o fármaco, período de tratamento, dose e via de administração.

Grupo	Fármaco	Período de tratamento	Dose	Via de administração
1- controle positivo (P60)	Pilocarpina	1-60 dias	0,05 mL	tópica
2-experimental (FS)	Fluoxetina	1-30 dias	20 mg/kg	intraperitoneal
	Soro Fisiológico	31-60 dias	0,1 mL	intraperitoneal
3-experimental (VS)	Venlafaxina	1-30 dias	40 mg/kg	intraperitoneal
	Soro Fisiológico	31-60 dias	0,1 mL	intraperitoneal
4-experimental (F30)	Fluoxetina	1-30 dias	20 mg/kg	intraperitoneal
5- experimental (V30)	Venlafaxina	1-30 dias	40 mg/kg	intraperitoneal
6- experimental (VP)	Venlafaxina	1-60 dias	40 mg/kg	intraperitoneal
	Pilocarpina	31-60 dias	0,05 mL	tópica
7- experimental (FP)	Fluoxetina	1-60 dias	20 mg/kg	intraperitoneal
	Pilocarpina	31-60 dias	0,05 mL	tópica
8- controle (S60)	Soro Fisiológico	1-60 dias	0,1 mL	intraperitoneal
9- controle (S30)	Soro Fisiológico	1-30 dias	0,1 mL	intraperitoneal

Sialometria

Segundo a metodologia descrita por Onofre²⁰, 30 horas após o término do tratamento procedeu-se a coleta da saliva. Os animais receberam duas gotas de pilocarpina a 4% (Allergan pilocarpina[®] 4%, Allergan Produtos Farmacêuticos Ltda., Guarulhos, Brazil) via oral, para estimular a salivação. Após um minuto, a saliva foi coletada num pote coletor universal que foi pesado em balança de alta precisão -

Belmark® U210A (Bel Engenharia, Piracicaba, Brasil), obtendo-se desta forma a velocidade do fluxo salivar (VFS).

Os valores da velocidade do fluxo salivar estimulado foram obtidos por gravimetria de acordo com a seguinte fórmula^{21, 22}:

$$\frac{\text{PESO DO POTE APÓS A COLETA(g)} - \text{PESO DO POTE ANTES DA COLETA(g)}}{\text{TEMPO(1min)}} = \text{VELOCIDADE DO FLUXO SALIVAR (mL/min)}$$

Excisão da Glândula parótida e medida de seu tamanho

Após o término de cada tratamento, os animais foram devidamente anestesiados e mortos por meio da administração intraperitoneal de Tiopental Sódico (Thionembutal®, Abbott Laboratórios do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) na dose de 100mg/kg.



Figura 2 - Balança utilizada para pesar os potes coletores e as glândulas salivares



Figura 3 – Tiopental sódico

As glândulas parótidas direita e esquerda foram removidas e medidas (no sentido longitudinal) com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo 500 Mical® (Mitutoyo Co. Tokio, Japão) e pesadas em balança de alta precisão Belmark® U210A (Bel Engenharia, Piracicaba, Brasil), obtendo-se assim o tamanho e a massa de cada glândula, respectivamente. Foi realizada a média do tamanho e da massa das glândulas, para obtenção das variáveis tamanho (T) e massa (M) para cada animal. Após a mensuração da peça, esta foi colocada em um recipiente previamente identificado, contendo formol a 10% por 48h. As peças cirúrgicas foram então seccionadas transversalmente seguindo o sentido epitélio-conjuntivo.



Figura 4 – Excisão da glândula parótida



Figura 5 – Paquímetro digital utilizado para medir as glândulas

Os espécimes foram processados de acordo com a rotina do laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, e confeccionadas as lâminas contendo dois cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (com 4 μ m de espessura), sendo um de cada glândula.

As lâminas foram examinadas em microscópio Olympus[®] BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), utilizando objetivas de 40X e 100X (com óleo de imersão). As imagens foram capturadas com câmera digital Sony[®] CCD-IRIS DXC-107A (Sony Eletronics Inc., Tokio, Japão) acoplada ao microscópio e a um microcomputador. Com auxílio de um programa para análise de imagens (Image-Pro[®] Plus, Cybernetics, Silverspring, EUA), avaliou-se os cortes histológicos frente à utilização dos antidepressivos e da pilocarpina.

Análise histomorfométrica

Para estabelecer as comparações entre os grupos, com relação a alterações do volume celular (VC), utilizaram-se as variáveis apresentadas no estudo de Onofre et al. (1997).

O volume da glândula salivar processada (Vp) foi calculado por meio da seguinte fórmula: $V_p = m/d \cdot rf$, onde m foi a massa fresca, d a densidade e rf o encolhimento ou dobramento causado pelo processamento histológico. Para este cálculo, $d = 1.089 \text{ g/cm}^3$ e $rf = 0,7$.

Para o cálculo da densidade do volume acinar (Vvi) utilizou-se a objetiva de 40X acoplada ao programa Image-Pro[®] Plus, onde se obteve uma grade com dez linhas horizontais e dez linhas verticais, determinando cem pontos, dos quais quarenta, foram escolhidos ao acaso. Nesses quarenta pontos escolhidos foram contados quantos pontos coincidiam com ácinos (Pi). Calculou-se, então, o Vvi por

meio da fórmula: $V_{vi}=P_i/P_t$, onde P_t refere-se ao número de pontos selecionados (40).

O volume total acinar foi obtido pela fórmula: $V_{ti}=V_{vi}.V_p$.

O volume dos núcleos das células acinares foi determinado pelas medidas do diâmetro ortogonal de 50 núcleos de cada grupo, usando a objetiva de 100X. Primeiro calculou-se o raio de cada núcleo com a fórmula $r^2=d_1.d_2$ e o volume nuclear pela expressão $V=4/3.\Pi.r^3$.

O volume do citoplasma foi calculado a partir do volume da densidade do núcleo e do citoplasma²³. Em cada lâmina foi contado o número de pontos que coincidiam com os núcleos (P_n) e com o citoplasma (P_{city}) das células acinares da glândula. A correção da densidade do volume nuclear (P_{ncorr}) foi calculada pela expressão $P_{ncorr} = (P_n/P_n+P_{city})/K_0$. Este fator de correção recebeu o nome de K_0 pelo cálculo da formula $K_0=1+3t/2d$, onde foi a densidade de cada núcleo e t a espessura do corte da lâmina.

Para corrigir a densidade do volume do citoplasma usou-se a equação $P_{cyticorr} = 1-P_{ncorr}$.

Da divisão do $P_{cyticorr}$ pelo P_{ncorr} foi obtido o R_c/n , citoplasma sobre núcleos das células acinares: $R_c/n = P_{cyticorr}/P_{ncorr}$.

Finalmente, calculou-se o volume citoplasmático (V_{cyti}) pela fórmula $V_{cyti}=V_{ni}.R_c/n$ e o volume celular (VC) pela fórmula $VC= V_{ni}+V_{cyti}$.

Análise Estatística

Para testar o pressuposto de normalidade das variáveis para cada grupo foi utilizado o teste de Komolgorov-Smirnov. O teste de Levene verificou a homogeneidade de variâncias entre os grupos.

Quando a análise de variância Anova acusou diferenças entre as médias dos grupos e tratamento, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey HSD para as variáveis que apresentaram homogeneidade de variâncias entre os grupos. Para as variáveis que não apresentaram homogeneidade de variâncias entre os grupos, utilizou-se o teste de Games-Howell.

Para todos os testes foi aplicado nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

ANEXO C – ANÁLISE ESTATÍSTICA DETALHADA

GRUPOS	VARIÁVEL	n	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
1	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,066	0,05	0,028
	Tamanho da Glândula Salivar	10	8,492	8,76	1,026
	Massa da Glândula Salivar	10	0,092	0,09	0,013
2	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,036	0,04	0,017
	Tamanho da Glândula Salivar	10	8,350	8,15	0,775
	Massa da Glândula Salivar	10	0,095	0,10	0,014
3	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,020	0,02	0,004
	Tamanho da Glândula Salivar	10	8,040	8,10	0,950
	Massa da Glândula Salivar	10	0,101	0,09	0,017
4	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,013	0,01	0,006
	Tamanho da Glândula Salivar	10	9,501	9,60	1,405
	Massa da Glândula Salivar	10	0,103	0,10	0,032
5	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,026	0,02	0,022
	Tamanho da Glândula Salivar	10	8,696	8,63	1,412
	Massa da Glândula Salivar	10	0,064	0,06	0,018
6	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,054	0,05	0,026
	Tamanho da Glândula Salivar	10	8,060	8,18	0,761
	Massa da Glândula Salivar	10	0,089	0,09	0,016
7	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,033	0,03	0,014
	Tamanho da Glândula Salivar	10	7,496	7,52	1,103
	Massa da Glândula Salivar	10	0,068	0,06	0,021
8	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,052	0,04	0,029
	Tamanho da Glândula Salivar	10	7,885	7,68	0,629
	Massa da Glândula Salivar	10	0,074	0,08	0,022
9	Velocidade do Fluxo Salivar	10	0,051	0,05	0,026
	Tamanho da Glândula Salivar	10	7,036	7,31	0,506
	Massa da Glândula Salivar	10	0,075	0,08	0,010

Estatísticas descritivas das variáveis VFS, T e M segundo os grupos

Teste de homogeneidade de variância

		Levene Statistic	Valor de p
Velocidade do Fluxo Salivar	Based on Mean	3,2531519	0,0002
Tamanho da Glândula Salivar	Based on Mean	1,0466972	0,4118
Massa da Glândula Salivar	Based on Mean	1,1584884	0,3144
Valor p < 0,05 indica que a variável não apresenta homogeneidade de variâncias entre os grupos			

Teste de Normalidade

	Grupos	Kolmogorov-Smirnov(a)		Valor p
		Statistic	df	
Velocidade do Fluxo Salivar	1	0,2539138	10	0,0669
	2	0,1319474	10	0,2000
	3	0,1292867	10	0,2000
	4	0,2476107	10	0,0830
	5	0,2502146	10	0,0760
	6	0,1989834	10	0,2000
	7	0,1716737	10	0,2000
	8	0,3866497	10	0,0001
	9	0,2357519	10	0,1223
Tamanho da Glândula Salivar	1	0,1940731	10	0,2000
	2	0,2873924	10	0,0189
	3	0,1894986	10	0,2000
	4	0,1580393	10	0,2000
	5	0,1342965	10	0,2000
	6	0,1997379	10	0,2000
	7	0,22665	10	0,1561
	8	0,2572292	10	0,0595
	9	0,2811719	10	0,0242
Massa da Glândula Salivar	1	0,1196325	10	0,2000
	2	0,2144271	10	0,2000
	3	0,2247498	10	0,1648
	4	0,325757	10	0,0035
	5	0,2173272	10	0,1985
	6	0,1408273	10	0,2000
	7	0,2451094	10	0,0903
	8	0,218469	10	0,1933
	9	0,2338348	10	0,1292
Valor p < 0,05 indica que a variável não apresenta dist. normal para o referido grupo				

Comparações entre os grupos: 4, 5, 9

ANOVA – 95% CONFIDENCE INTERVAL				
		F	Sig.	
Velocidade do Fluxo Salivar	Between Groups	9,0994176	0,0010	
	Within Groups			
	Total			
Tamanho da Glândula Salivar	Between Groups	11,233738	0,0003	
	Within Groups			
	Total			
Massa da Glândula Salivar	Between Groups	8,6735169	0,0012	
	Within Groups			
	Total			
Multiple Comparisons				
Dependent Variable		(I) Grupos	(J) Grupos	Sig.
	Games-Howell	4	5	0,2463
			9	0,0031
		5	4	0,2463
			9	0,0794
		9	4	0,0031
			5	0,0794
Tamanho da Glândula Salivar	Tukey HSD	4	5	0,2990
			9	0,0002
		5	4	0,2990
			9	0,0112
		9	4	0,0002
			5	0,0112
Massa da Glândula Salivar	Tukey HSD	4	5	0,0011
			9	0,0190
		5	4	0,0011
			9	0,5073
		9	4	0,0190
			5	0,5073

Comparações entre os grupos: 1, 2, 3, 6, 7, 8

ANOVA- 95% CONFIDENCE INTERVAL				
		F	Sig.	
Velocidade do Fluxo Salivar	Between Groups	6,1347243	0,0001	
	Within Groups			
	Total			
Tamanho da Glândula Salivar	Between Groups	1,5666657	0,1852	
	Within Groups			
	Total			
Peso da Glândula Salivar	Between Groups	5,276334	0,0005	
	Within Groups			
	Total			
Multiple Comparisons				
Dependent Variable		(I) Grupos	(J) Grupos	Sig.
Velocidade do Fluxo Salivar	Games-Howell	1	2	0,0875
			3	0,0047
			6	0,9163
			7	0,0451
			8	0,8542
		2	1	0,0875
			3	0,1108
			6	0,4571
			7	0,9984
			8	0,6779
		3	1	0,0047
			2	0,1108
			6	0,0214
			7	0,0990
			8	0,0566
		6	1	0,9163
			2	0,4571
			3	0,0214
			7	0,2730
			8	0,9999
		7	1	0,0451
			2	0,9984
			3	0,0990
			6	0,2730
			8	0,4826
		8	1	0,8542
			2	0,6779
			3	0,0566
			6	0,9999
			7	0,4826
Tamanho da Glândula Salivar	Tukey HSD	1	2	0,9992
			3	0,8640
			6	0,8853

			7	0,1411
			8	0,6502
		2	1	0,9992
			3	0,9697
			6	0,9775
			7	0,2790
			8	0,8495
		3	1	0,8640
			2	0,9697
			6	1,0000
			7	0,7458
			8	0,9988
		6	1	0,8853
			2	0,9775
			3	1,0000
			7	0,7154
			8	0,9978
		7	1	0,1411
			2	0,2790
			3	0,7458
			6	0,7154
			8	0,9226
		8	1	0,6502
			2	0,8495
			3	0,9988
			6	0,9978
			7	0,9226
Massa da Glândula Salivar	Tukey HSD	1	2	0,9997
			3	0,8870
			6	0,9973
			7	0,0351
			8	0,1850
		2	1	0,9997
			3	0,9677
			6	0,9747
			7	0,0161
			8	0,1007
		3	1	0,8870
			2	0,9677
			6	0,6401
			7	0,0015
			8	0,0132
		6	1	0,9973
			2	0,9747
			3	0,6401
			7	0,1069
			8	0,4071
		7	1	0,0351
			2	0,0161
			3	0,0015
			6	0,1069

			8	0,9784
		8	1	0,1850
			2	0,1007
			3	0,0132
			6	0,4071
			7	0,9784

Estatísticas descritivas da variável VC segundo os grupos

GRUPOS	n	MÉDIA	MEDIANA	DESVIO PADRÃO
1	50	5825,418	5409,969	1968,070
2	50	6809,347	5787,380	3189,246
3	50	7525,112	7296,455	3196,085
4	50	10384,305	10564,614	4869,539
5	50	11945,905	9115,067	7891,179
6	50	10194,315	10735,643	4456,345
7	50	7519,797	7110,968	4272,808
8	50	6505,564	5429,555	3343,475
9	50	6965,683	6289,4634	3792,951

Teste de homogeneidade de variância

		Levene Statistic	Sig.
Vc	Based on Mean	31,71141296	0,0000
Valor p < 0,05 indica que a variável não apresenta homogeneidade de variâncias entre os grupos			

Comparações entre os grupos: 4, 5, 9

ANOVA		
Volume Celular		
	F	Sig.
Between Groups	9,696200844	0,0001
Within Groups		
Total		

Multiple Comparisons		
Dependent Variable: Volume Celular		
Games-Howell		
(I) Grupos	(J) Grupos	Sig.
	4	5
		9
	5	4
		9
	9	4
		5

Comparações entre os grupos: 1, 2, 3, 6, 7, 8

ANOVA		
Volume Celular		
	F	Sig.
Between Groups	9,353311515	0,0000
Within Groups		
Total		
Multiple Comparisons		
Dependent Variable: Volume Celular		
Games-Howell		
(I) Grupos	(J) Grupos	Sig.
	1	2
		3
		6
		7
		8
	2	1
		3
		6
		7
		8
	3	1
		2
		6
		7
		8
	6	1
		2
		3
		7

	8	0,0001
7	1	0,1250
	2	0,9344
	3	1,0000
	6	0,0327
	8	0,7722
8	1	0,8160
	2	0,9972
	3	0,6274
	6	0,0001
	7	0,7722
* The mean difference is significant at the .05 level.		

ANEXO D – NORMAS DA REVISTA

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

Submissions

Authors are requested to submit their original manuscript and figures online via Editorial Manager [replace with EES]. Editorial Manager [replace with EES] is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Each manuscript must be accompanied by a statement signed by the corresponding author that the manuscript in its submitted form has been read and approved by all authors. Authors should supply details of related papers submitted or recently published elsewhere.

If the manuscript reports experiments or observations using animals or human subjects a statement must be included in the letter of submission indicating that the protocol has been examined and approved by an institutional review board.

Authors are invited to suggest up to three referees they consider suitable to review their submission. Full postal and Email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilise these suggestions.

Scientific Standards

The aim of Editors and referees is to maintain a high standard of scientific communication. Normally papers are assessed by two referees selected by the Editor, and decisions regarding acceptance are based mainly upon the advice of the referees. Where appropriate, the referees' views are forwarded to the authors for their consideration. Authors may occasionally consider referees' suggestions to be ill-conceived but if their text is misunderstood by referees it is likely to be misunderstood by readers of the journal.

Types of Contributions

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Manuscript Preparation

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal, English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be in English or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods,

Results or Findings, Discussion.

Authors will gain much assistance by consulting: Edward J. Huth, *Scientific Style and Format* (Sixth Edition). The Council of Biology Editors Manual for Authors, Editors and Publishers, Cambridge.

Editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the Journal's standards of clarity and conciseness.

General

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. For hardcopy submissions, good quality printouts are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgments, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Title page

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic or histochemical etc. A "running title" with not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstracts

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the *Journal of the American Medical Association* (JAMA 1995;273: 27- 34). In brief, the abstract should be divided into sections including the following: (1) Objective; (2) Design -if clinical to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Received/Accepted Dates

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor. An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work. Authors are requested to make plain that the conditions of animal experiments were humane; for instance, the mode of anaesthesia and of killing should be specified. In human experimentation, authors should state briefly that the subjects gave informed consent, and preferably that the work was approved by an appropriate ethics committee or review board.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

It is usually necessary to analyze numerical results statistically. A statement of the number, their mean value and some appropriate measure of their variability is usually sufficient. The method of analysis followed should be indicated. A statement that the difference between the mean values of two groups of data is statistically significant should give the probability level set as significant by the investigator and indicate the statistical test used. It is not sufficient to quote the use of a statistical package without naming the tests used.

Discussion

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

Acknowledgments

As appropriate.

References:

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to British Standard 4148: 1975 (or left in full), year, volume, and first and last pages.

For example:

1. Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 423-427.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

2. Gorlin RJ, Pindborg JJ, Cohen MM Jr. Syndromes of the Head and Neck, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, 1976.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Units and Symbols

In general, *Archives of Oral Biology* will use the recommended SI (Système Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm³ and ml³ in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology Editors Style Manual (1978) 4th edn, published by Council of Biology Editors Inc. Units of enzyme activity must be clearly defined, preferably using SI units. Centrifugal force should be stated in multiples of g, rather than as rev/min.

Units and abbreviations

As *Archives of Oral Biology* is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below should be avoided if possible. Examples of abbreviations which maybe used without definition:

ADP,
AMP,
ATP
DEAE-cellulose
DNA, RNA
EDTA
EMG
tris

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page.

Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Bacterial nomenclature. Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and underlined to denote italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case roman not underlined, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to underline e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case roman e.g. 'meningococcus'.

Numbers, measurements and statistics. Numbers one to nine are spelled unless they are measurements (e.g. 5 mL). Numbers greater than nine are spelled out if they begin in a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than -1 or per.

Abbreviations. Use capitals for: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Group A, B etc. for antigenic or other groups, PHLS, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, P(probability). Use sp. and spp. (species, singular and plural). Use Gram's stain and Gram-negative bacillus. Use in-vitro (adjective) but in vitro (adverb), post-mortem (adjective) but post mortem (adverb). Spelling. Use British spellings: Haemophilus, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes).

Drugs. These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary.

Proprietary Names

So far as possible, proper names should be used instead of proprietary names. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparations, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. Testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, 327 Farm Road, London E23).

Illustrations

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching).

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on www.elsevier.com/arkworkinstructions. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

General: Information relating to the preferred formats for Artwork and Illustrations may be found at www.elsevier.com/authors. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All hard copy illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome.

Please note that if figures are supplied in colour, they will automatically be available online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Acceptance

After acceptance, authors **may** be requested to provide Elsevier with hard-copy and electronic versions of their manuscript and their figures. The electronic copy, on floppy disk, CD-ROM or ZIP, should match the hardcopy exactly, therefore always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from www.elsevier.com/authors.

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from www.elsevier.com/authors.

Hardcopy submissions

Authors should submit an electronic copy of their paper with the final version of the manuscript. The electronic copy should match the hardcopy exactly.

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from Author Services at Elsevier.

Proofs

Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multiauthored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible.

Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete. Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK.

Offprints

Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders placed late (after publication) for reprints will incur a 50% surcharge.

Copyright

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit www.elsevier.com/authors. This website provides information on article submission as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.