



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

TATIANA MARIA FOLADOR MATTIOLI

**EFEITOS DE PSICOTRÓPICOS E DA PILOCARPINA
SOBRE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS.
ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.**

**DOUTORADO EM
ODONTOLOGIA
PUCPR**

PUCPR

**CURITIBA
2009**



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

TATIANA MARIA FOLADOR MATTIOLI

**EFEITOS DE PSICOTRÓPICOS E DA PILOCARPINA
SOBRE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS.
ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.**

**CURITIBA
2009**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

M444e 2009	<p>Mattioli, Tatiana Maria Folador</p> <p>Efeitos de psicotrópicos e da pilocarpina sobre glândulas parótidas de ratos : estudo imunistoquímico / Tatiana Maria Folador Mattioli ; orientadora, Luciana Reis Azevedo Alanis ; co-orientadora, Ana Maria Trindade Grégio. – 2009.</p> <p>vi, 90, [8] f. : il. ; 30 cm</p> <p>Tese (doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009</p> <p>Bibliografia: f. 88-90</p> <p>1. Antidepressivos. 2. Benzodiazepinas. 3. Imunohistoquímica. 4. Glândulas salivares. 5. Glândulas parótidas. I. Alanis, Luciana Reis Azevedo. II. Grégio, Ana Maria Trindade. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.</p> <p>20. ed. – 616.8527061</p>
---------------	---

TATIANA MARIA FOLADOR MATTIOLI

**EFEITOS DE PSICOTRÓPICOS E DA PILOCARPINA
SOBRE GLÂNDULAS PARÓTIDAS DE RATOS.
ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração em Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Reis Azevedo Alanis

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Trindade Grégio

CURITIBA
2009

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora Prof.^a Dra. Luciana Reis Azevedo Alanis, que é um exemplo de profissional completa, tanto pela sua integridade moral e ética, quanto por seu conhecimento, dedicação e experiência. A sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, sensata e criativa auxiliaram em minha formação. Obrigada pela excelente orientação.

A minha co-orientadora Prof.^a Dra. Ana Maria Trindade Grégio, suas qualidades fazem que seja modelo de conduta profissional, por seu caráter, seriedade e competência. Sua orientação contribuiu de forma intensa para a realização deste trabalho. Seu conhecimento em farmacologia norteou a compreensão de nossos resultados. Obrigada pela excelente orientação.

À Prof.^a Dra. Lucia Noronha e sua equipe do laboratório de patologia experimental da PUCPR, especialmente Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo, pela colaboração na realização dos testes imunoistoquímicos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio, pela pronta disposição em nos atender, pela sua sabedoria e dedicação. Obrigada pela colaboração na análise estatística.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À meus pais Atílio e Maria Teresa.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) instituição de ensino que me proporcionou crescimento técnico, científico e cultural durante toda a minha formação superior.

Ao Prof.Dr. Monir Tacla, Diretor do Curso de Odontologia, ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Vieira, diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e ao Coordenador da área de concentração Estomatologia, Prof. Dr. Paulo Henrique Couto de Souza.

Aos professores Dr. Júlio César Bisinelli; Narciso Grein e Luiz Carlos Gambus, primeiros mestres que me apresentaram e ensinaram a amar a Estomatologia. Obrigada pela confiança depositada em mim e pelo incentivo desde o início da graduação em Odontologia.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Odontologia da PUCPR pelo conhecimento e disponibilidade de nos auxiliar sempre quando preciso.

À Prof.^a Dra. Lucia Noronha, Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima, Prof.^a Dra. Paula Cristina Trevilatto, Prof.^a Dra. Maria Ângela Naval Machado e Silvana Da Silva pela colaboração na pesquisa.

Às funcionárias dos Laboratórios de Patologia Experimental da PUCPR, especialmente Ana Paula Camargo Martins e Marina Luise Viola de Azevedo, pelo auxílio durante os testes imunoistoquímicos.

À secretária do Curso de Pós- Graduação da PUCPR e amiga Neide Reis Borges.

Aos meus colegas de doutorado, em especial Lucia Fátima de Castro Ávila pela amizade e incentivo.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 ARTIGO 1	4
PÁGINA TÍTULO	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MÉTODOS	9
ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
RESULTADOS	12
DISCUSSÃO	14
CONCLUSÃO	21
AGRADECIMENTOS	21
REFERÊNCIAS	22
TABELAS	27
FIGURAS	30
3 ARTIGO 1A	33
TITLE PAGE	34
ABSTRACT	35
INTRODUCTION	36
METHODS	37
STATISTICAL ANALYSIS	40
RESULTS	40
DISCUSSION	42
CONCLUSION	48
ACKNOWLEDGEMENTS	48
REFERENCES	50

TABLES	55
FIGURES	58
4 ARTIGO 2	61
PÁGINA TÍTULO	62
RESUMO	63
ABSTRACT	64
INTRODUÇÃO	65
MÉTODOS	66
ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
RESULTADOS	70
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÃO	77
AGRADECIMENTOS	77
REFERÊNCIAS	78
TABELAS	82
FIGURAS	85
5 REFERÊNCIAS	88
6 ANEXOS	91
ANEXO 1 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	92
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CNPq	93
ANEXO 3 - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO	94

Resumo

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento das células acinares, ductais e mioepiteliais de glândulas parótidas de ratos sob tratamento com antidepressivos, benzodiazepínicos e pilocarpina.

Métodos: Cento e cinquenta ratos machos Wistar foram distribuídos em quinze grupos. Os grupos controle receberam solução salina durante 30 (C30) e 60 dias (C60) e pilocarpina (PILO) durante 60 dias. Os grupos experimentais receberam fluoxetina (F30), venlafaxina (V30), lorazepam (L30) e midazolam (D30) durante 30 dias; fluoxetina (FS60), venlafaxina (VS60), lorazepam (LS60) e midazolam (DS60) associado a salina durante 60 dias, e fluoxetina (FP60), venlafaxina (VP60), lorazepam (LP60) e midazolam (DP60) associado com pilocarpina durante 60 dias. Os espécimes das glândulas parótidas foram processados. A expressão imunohistoquímica da calponina foi avaliada nas células mioepiteliais e do PCNA nas células acinares e ductais. ANOVA, Tukey HSD e Games-Howell foram aplicados para detectar diferenças entre os grupos ($p < 0,05$).

Resultados: O uso crônico de antidepressivos durante 30 dias (F30 e V30) provocou aumento no número de células marcadas pela calponina comparado ao controle ($p < 0,05$). A venlafaxina (V30) provocou aumento no número de células marcadas pelo PCNA quando administrada durante 30 dias. Fluoxetina e pilocarpina (FP60) induziram diminuição significativa no número de células marcadas pela calponina ($p < 0,05$). Os grupos tratados com lorazepam mostraram aumento no número de células marcadas pela calponina comparados aos controles ($p < 0,05$). O grupo tratado com midazolam e pilocarpina (MP60) induziu aumento na proliferação de células acinares e

ductais e diminuição nas células marcadas pela calponina comparado ao grupo tratado com midazolam e salina (MS60).

Conclusões: O uso crônico de venlafaxina e fluoxetina durante 30 dias induziram aumento do número de células mioepiteliais marcadas pela calponina. Venlafaxina, fluoxetina e pilocarpina não induziram alterações na proliferação de células acinares e ductais de glândulas parótidas de ratos tratados durante 60 dias. As células mioepiteliais mostraram-se mais sensíveis aos efeitos dos benzodiazepínicos do que as células acinares e ductais nas glândulas parótidas de ratos.

Palavras-Chave

Antidepressivos; Benzodiazepínicos; Imunoistoquímica; Glândulas salivares parótidas

Abstract

Objectives: The aim of this study was to evaluate the effects of antidepressants, benzodiazepines and pilocarpine on rat parotid glands and on the behavior of acinar, ductal and myoepithelial cells.

Methods: One hundred and fifty male Wistar rats were allocated to fifteen groups. Control groups received saline during 30 (C30) and 60 days (C60), and pilocarpine (PILO) during 60 days. Experimental groups received fluoxetine (F30), venlafaxine (V30), lorazepam (L30) and midazolam (D30) during 30 days; fluoxetine (FS60), venlafaxine (VS60), lorazepam (LS60) and midazolam (DS60) associated with saline during 60 days, and fluoxetine (FP60), venlafaxine (VP60), lorazepam (LP60) and midazolam (DP60) associated with pilocarpine during 60 days. The immunohistochemical expression of calponin on myoepithelial cells, and of PCNA on acinar and ductal cells was evaluated. ANOVA, Tukey HSD and Games-Howell tests were applied to detect differences among the groups ($p < 0.05$).

Results: Antidepressants chronic use during 30 days induced an increase in the number of positive staining cells for calponin compared with controls ($p < 0.05$). Venlafaxine induced an increase in the number of positive staining cells for PCNA when administered during 30 days. Fluoxetine and pilocarpine (FP60) induced a significant decrease in the number of positive staining cells for calponin compared with all groups ($p < 0.05$). Groups treated with lorazepam showed an increase in the number of positive staining cells for calponin when compared with controls ($p < 0.05$). Midazolam associated with pilocarpine (MP60) induced an increase in the proliferation of acinar and ductal cells and a

decrease in the positive staining cells for calponin compared with midazolam associated with saline (MS60).

Conclusions: Chronic use of venlafaxine and fluoxetine during 30 days induced an increase in the number of positive staining cells for calponin. Venlafaxine, fluoxetine and pilocarpine did not induce changes in the proliferation of acinar and ductal cells in rat parotid glands treated during 60 days. Myoepithelial cells showed to be more sensible to the effects of benzodiazepines than acinar and ductal cells in rat parotid glands.

Key Words:

Antidepressants; Benzodiazepines; Immunohistochemistry; Parotid salivary glands

1. Introdução

A saliva produzida pelas glândulas salivares pode ser modificada por influência de fatores intrínsecos fisiológicos, como regulação neurológica, emocional e hormonal, e de fatores extrínsecos, como radiações ionizantes e medicamentos.¹ Receptores α , β , M_3 e GABA estão presentes na superfície das células por vários neurotransmissores, que podem ser alteradas pela utilização de fármacos psicotrópicos.³

A atividade fisiológica da secreção salivar é regulada pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático por meio dos receptores presentes nas glândulas salivares. A estimulação parassimpática por meio de ações da acetilcolina sobre receptores muscarínicos M_3 (transmissão colinérgica) aumenta a quantidade de saliva secretada e regula a liberação de água e eletrólitos. A estimulação simpática por meio de ações da noradrenalina sobre receptores α e β -adrenérgicos (transmissão noradrenérgica) controla principalmente o conteúdo das proteínas e íons salivares.²

Pesquisas clínicas e laboratoriais com metodologias distintas têm demonstrado que fármacos psicotrópicos, tais como antidepressivos e benzodiazepínicos (BZDs), produzem efeitos adversos sobre o fluxo salivar e sua composição bioquímica e protéica.⁴⁻⁶ As diferenças dos efeitos adversos ocorrem em função da farmacocinética e farmacodinâmica dos psicotrópicos; estudos com indivíduos doentes *versus* voluntários saudáveis *versus* portadores de co-morbidades psíquicas e somáticas *versus* animais; dose única *versus* administração aguda *versus* administração crônica; meia vida plasmática *versus* duração do estudo; biodisponibilidade das preparações comerciais *versus* fármacos manipulados e interações medicamentosas.⁷

As diversas classes de antidepressivos possuem ações anticolinérgicas de diferentes intensidades. Eles interferem na ligação do neurotransmissor acetilcolina com o receptor muscarínico M₃ na fenda sináptica, resultando em diminuição da secreção salivar.^{1,2} Os BZDs diminuem a secreção salivar por meio de receptores para BZDs presentes nas glândulas salivares e também por ações indiretas do sistema nervoso central sobre as glândulas salivares por meio de receptores centrais para BZDs.^{3,8}

Apesar de estudos bioquímicos, moleculares, histológicos e clínicos realizados, o complexo processo de formação e secreção salivar e a inter-relação com drogas psicotrópicas ainda não foi totalmente elucidado.^{3,8-12}

Em 2006, Grégio et al.⁹ descreveram a presença de hipertrofia de células serosas em glândulas parótidas e hipossalivação em ratos sob tratamento crônico com a associação de BZDs (Diazepam[®]) e antidepressivo (Tryptanol[®]). Os autores sugeriram que, frente ao uso crônico da associação de psicotrópicos, a saliva parecia ser produzida normalmente, no entanto, ela se mantinha retida no interior das células acinares, o que explicaria a hipertrofia, e, por mecanismos desconhecidos, não era expelida. Foi sugerida uma possível inibição da atividade das células mioepiteliais, decorrente de estimulação nervosa, ou diminuição no número destas células para explicar a hipossalivação. As células mioepiteliais são células não musculares que exercem funções contráteis, contribuindo para o esvaziamento da secreção das unidades secretoras e dos ductos.^{13,14}

Na literatura, não há estudos imunoistoquímicos sobre o comportamento das células mioepiteliais, acinares e ductais frente à utilização de psicotrópicos.

O comportamento de células parenquimatosas tem sido avaliado em processos patológicos inflamatórios, atróficos e proliferativos.¹⁵⁻¹⁹

Por vários anos, acreditou-se que as células parenquimatosas (mioepiteliais, acinares e ductais) das glândulas salivares desenvolvidas e em desenvolvimento não apresentavam capacidade proliferativa e de renovação. Assim, o crescimento e a reposição celular eram dependentes de células de reserva ou de células indiferenciadas presentes em glândulas salivares normais, que funcionariam como fonte para a renovação celular, e da indução de tumores, pois só estas teriam condições de proliferar.^{15,20} No entanto, atualmente, estes conceitos são refutados, pois células bem diferenciadas, como as acinares, ductais e as mioepiteliais, são facilmente identificadas em glândulas salivares normais em processos de mitoses. A capacidade reprodutiva, proliferativa e de renovação celular destas células foi comprovada em vários experimentos *in vivo* de indução de atrofia glandular após obstrução e desobstrução do ducto excretor principal de glândulas salivares.²⁰⁻²²

Neste trabalho, o comportamento das células mioepiteliais, acinares e ductais de ratos sob tratamento crônico com psicotrópicos (antidepressivos e BZDs) foi avaliado por meio de estudo imunoistoquímico com a utilização de dois imunorreagentes: o anticorpo contra o antígeno calponina, utilizado para identificar células mioepiteliais²³ e o anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), um marcador de proliferação celular capaz de identificar células acinares e ductais em proliferação.¹⁵

**2. Artigo 1. Efeitos de antidepressivos e da pilocarpina
sobre glândulas parótidas de ratos. Estudo
imunoistoquímico.**

Título: Efeitos de antidepressivos e da pilocarpina sobre glândulas parótidas de ratos. Estudo imunoistoquímico.*

Tatiana Maria Folador Mattioli, DDS, MSc^a, Silvana da Silva, DDS, MSc^a, Ana Maria Trindade Grégio, PharmaB, PhD^b, Maria Ângela Naval Machado, DDS, PhD^b, Paula Cristina Trevilatto, DDS, PhD^b, Luciana Reis Azevedo-Alanis, DDS, PhD^c

^a Post-graduate student, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^b Titular professor, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^c Adjunct professor, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Autor correspondente:

Luciana Reis Azevedo-Alanis

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Pós-graduação em Odontologia

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho 80215-901

Curitiba, Paraná, Brazil

Phone: +55 (41) 3271-2592

Fax: +55 (41) 3271-1405

l.azevedo@pucpr.br

* Artigo formatado nas normas do periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* (ver anexo 3).

Resumo

Objetivo: Avaliar o comportamento das células mioepiteliais, acinares e ductais de glândulas parótidas de ratos sob tratamento com antidepressivos e pilocarpina.

Métodos: Noventa ratos machos Wistar foram divididos em nove grupos. Os grupos controle receberam solução salina durante 30 (C30) e 60 dias (C60) e pilocarpina (PILO) por 60 dias. Os grupos experimentais receberam fluoxetina (F30) e venlafaxina (V30) por 30 dias; fluoxetina (FS60) e venlafaxina (VS60) associado a salina por 60 dias; e fluoxetina (FP60) e venlafaxina (VP60) associado a pilocarpina por 60 dias. Os espécimes das glândulas parótidas foram processados. A expressão imunohistoquímica da calponina foi avaliada nas células mioepiteliais e do PCNA, nas células parenquimatosas. ANOVA, Tukey HSD e Games-Howell foram aplicados para detectar diferenças entre grupos ($p < 0,05$).

Resultados: O uso crônico de antidepressivos por 30 dias provocou aumento no número de células marcadas pela calponina comparado ao controle ($p < 0,05$). A venlafaxina (V30) provocou aumento no número de células marcadas pelo PCNA. Fluoxetina e pilocarpina (FP60) induziram diminuição significativa no número de células marcadas pela calponina ($p < 0,05$).

Conclusões: O uso crônico de venlafaxina e fluoxetina durante 30 dias induziu aumento do número de células mioepiteliais marcadas pela calponina. Venlafaxina, fluoxetina e pilocarpina não induziram alterações na proliferação de células acinares e ductais de parótidas de ratos tratados durante 60 dias.

Palavras-Chave

Antidepressivos; Imunohistoquímica; Glândulas salivares parótidas

Abstract

Objectives: To evaluate the effects of antidepressants and pilocarpine on the behavior of myoepithelial, acinar and ductal cells on rat parotid glands.

Study design: Ninety male Wistar rats were allocated to nine groups. Control groups received saline during 30 (C30) and 60 days (C60), and pilocarpine (PILO) during 60 days. Experimental groups were dealt with fluoxetine (F30) and venlafaxine (V30) during 30 days; fluoxetine (FS60) and venlafaxine (VS60) associated with saline during 60 days; and fluoxetine (FP60) and venlafaxine (VP60) associated with pilocarpine during 60 days. Parotid glands specimens were processed. The immunohistochemical expression of calponin and PCNA on myoepithelial and parenchymal cells, respectively, was evaluated. ANOVA, Tukey HSD and Games-Howell tests were applied to detect differences among the groups ($p < 0.05$).

Results: Antidepressants chronic use during 30 days induced an increase in the number of positive staining cells for calponin compared with controls ($p < 0.05$). Venlafaxine used during 30 days (V30) induced an increase in the number of positive staining cells for PCNA. Fluoxetine and pilocarpine (FP60) induced a significant decrease in the number of positive staining cells for calponin compared with all groups ($p < 0.05$).

Conclusions: Chronic use of venlafaxine and fluoxetine during 30 days induced an increase in the number of positive staining cells for calponin. Venlafaxine, fluoxetine and pilocarpine did not induce changes in the proliferation of acinar and ductal cells in rat parotid glands treated during 60 days.

Key Words

Antidepressants; immunohistochemistry; parotid salivary glands

Introdução

A atual geração de antidepressivos é constituída por fármacos que agem em um único neurotransmissor, como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (fluoxetina) ou de noradrenalina (reboxetina) ou em múltiplos neurotransmissores (venlafaxina), sem ter como alvo outros sítios receptores cerebrais não relacionados com a depressão, tais como, histamina e acetilcolina.¹⁻³ A venlafaxina é um inibidor seletivo da recaptação de serotonina e noradrenalina, e apresenta fraca atividade como inibidor da recaptação de dopamina, clinicamente significativo apenas em doses elevadas.^{1,4,5} Os atuais antidepressivos diferem dos clássicos antidepressivos tricíclicos e dos inibidores da monoaminoxidase, irreversíveis pela seletividade farmacológica, modificando e atenuando os efeitos colaterais.⁶

Numa revisão sistemática Cochrane (1966-2004), os efeitos adversos da fluoxetina (sensação de boca seca, tontura e sudorese) foram comparados aos efeitos adversos dos antidepressivos mais recentes (venlafaxina, reboxetina, fenelzina, nefazodona) e mostraram-se mais brandos do que os últimos.⁷

Hipossalivação, xerostomia e alterações na composição da saliva são importantes efeitos colaterais relacionados à utilização de fármacos psicotrópicos, dentre eles, os antidepressivos.⁸⁻¹⁴ O mecanismo de como ocorrem estes efeitos colaterais ainda não está totalmente esclarecido, no entanto, estudos histomorfométricos, sialoquímicos e sialométricos vêm contribuindo para o entendimento dos efeitos citotóxicos dos psicotrópicos nas glândulas salivares.¹²⁻¹⁵

Grégio et al., em 2006,¹² ao estudar o efeito do tratamento crônico da associação de benzodiazepínico (Diazepam[®]) e antidepressivo (Tryptanol[®])

sobre glândulas parótidas de ratos, observaram hipossalivação e hipertrofia das células serosas, o que sugeriu uma possível inibição da atividade das células mioepiteliais, decorrente de estimulação nervosa, diminuição no número destas células frente ao uso crônico dos psicotrópicos, ou alteração no número de células acinares e ductais.

As células mioepiteliais, localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática de células acinares secretoras e dos ductos intercalados, exercem funções contráteis, contribuindo para o esvaziamento da secreção das unidades secretoras e dos ductos.^{16,17} A calponina é uma proteína presente nas células mioepiteliais e está envolvida no sistema de regulação da contração do músculo liso.¹⁸ As células acinares secretoras e ductais são células epiteliais com capacidade proliferativa e de renovação.¹⁹⁻²³

O objetivo deste estudo foi analisar o comportamento das células mioepiteliais e das células acinares e ductais das parótidas de ratos tratados com fluoxetina e venlafaxina, por meio de imunorreação com a calponina e o PCNA.

Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tuiuti do Paraná (CEP-UTP n. 55/2003).

A amostra foi constituída por glândulas parótidas de ratos machos, tipo *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *mammalia* da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 250 g, incluídas em blocos de parafina e provenientes do acervo do laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Foram utilizados 90 animais, divididos em nove

grupos, cada grupo constituído por 10 animais. Os animais receberam diferentes terapêuticas, conforme descrito na Tabela 1.¹⁵

Cada *tissue microarray* (TMA) continha 10 amostras de 3 mm de diâmetro^{24,25} de glândulas parótidas de ratos. Foram realizados cortes microscópicos com 4 µm de espessura e, em seguida, as lâminas obtidas foram submetidas aos testes imunohistoquímicos.

Para a técnica da imunohistoquímica foram utilizados os anticorpos anti-calponina e anti-PCNA. Ambos foram diluídos com diluente da Dako (DakoCytomation®; Dako North America, Carpinteria, CA, USA). O anticorpo secundário utilizado foi EnVision®+Dual Link/Peroxidase (DakoCytomation®) e para as revelações das ligações antígeno-anticorpo, utilizou-se o sistema substrato-cromógeno DAB (DakoCytomation®). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris.

Para a marcação das células mioepiteliais, foi utilizado o anticorpo monoclonal contra o antígeno calponina (C) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). As imunorreacções com a C utilizaram diluição do anticorpo em 1:800. Para a marcação das células acinares e ductais em proliferação, foi utilizado o anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA (Dako Corporation). O PCNA é um anticorpo monoclonal que possibilita o estudo da cinética celular. As imunorreacções com o PCNA utilizaram diluições do anticorpo em 1:400.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), utilizando objetiva de 40X, por um único examinador (T.M.F.M.). A expressão imunohistoquímica da C nas células mioepiteliais e do PCNA nas células acinares e ductais foi analisada

verificando-se imagens de 24 campos histológicos, equivalentes a toda a área do TMA.

Todos os espécimes estudados exibiram positividade para o anticorpo C, sendo considerada positiva a célula que exibiu qualquer expressão para a C no epitélio glandular, representada por cor acastanhada, independente da intensidade da marcação, ou seja, o suficiente para diferenciação entre as células positivas e negativas.

Foi avaliada a presença ou ausência de marcação para o anticorpo PCNA. Considerou-se positiva a célula que exibiu qualquer expressão para o PCNA no epitélio glandular, representada por cor acastanhada, independente da intensidade da marcação.

Considerou-se que em cada TMA havia 24 campos histológicos. Previamente à contagem do número de células marcadas pelos anticorpos, foram verificados quantos campos dentre os 24 eram possíveis de serem avaliados. Para isso, foi levada em consideração a integridade e a qualidade do tecido, e a presença de artefatos de técnica. Após a avaliação dos 24 campos histológicos de todos os TMA, foram obtidos os índices numéricos das células marcadas positivamente para a C e para o PCNA.

Para determinar o valor médio do número de células marcadas pela C e pelo PCNA de cada TMA, foi realizado o seguinte cálculo: valor médio de células marcadas no TMA foi igual à soma do número de células marcadas em cada campo avaliado, dividido pelo número de campos avaliados. Após a obtenção do valor médio de cada TMA, os mesmos foram somados e divididos por 10 (equivalente ao número total de TMA) e, assim, foi obtido o valor médio de células marcadas de cada grupo.

Além das variáveis C e PCNA, foram utilizados neste trabalho, os valores médios das variáveis fluxo salivar estimulado (FSE) e volume celular (VC), obtidos do trabalho de Da Silva et al., 2009¹⁵ (Tabela 2 e 3). Uma vez que ambos os trabalhos estudaram a mesma amostra, foram comparados os achados do FSE e do VC com os resultados da marcação imunoistoquímica pela C e PCNA.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio do software SPSS versão 15.0 para Windows. A normalidade das variáveis e a homogeneidade de variâncias foram analisadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente.

Para os grupos que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Anova a 01 critério. Quando Anova a 01 critério 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.

Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Dos nove grupos avaliados, três (C30, F30, V30) receberam tratamento durante 30 dias, enquanto os outros seis grupos (C60, Pilo, FS60, VS60, FP60, VP60) foram tratados por 60 dias. As variáveis analisadas foram a expressão

do anticorpo anti-calponina (C) e a expressão do anti – PCNA (PCNA), as quais foram comparadas às variáveis VC e FSE.¹⁵

Grupos tratados por 30 dias

A Tabela 2 mostra os valores médios, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas segundo os grupos tratados por 30 dias (C30, F30 e V30). Houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados por 30 dias para as variáveis FSE, VC, PCNA e C ($p < 0,05$).

Para FSE, houve diferença significativa entre C30 e F30 ($p = 0,0007$) e, C30 e V30 ($p = 0,0250$). O grupo C30 apresentou o maior valor médio de FSE comparado aos grupos F30 e V30.

Para C, houve diferença significativa entre os grupos C30 e F30 ($p = 0,0066$) e, C30 e V30 ($p = 0,0086$). Os maiores valores médios de C foram observados nos grupos F30 e V30, comparado ao C30.

Para PCNA, houve diferença estatística significativa entre os grupos F30 e V30 ($p = 0,0006$) e, V30 e C30 ($p = 0,0001$), sendo o menor valor médio de PCNA no grupo C30 e o maior no grupo V30.

Os valores médios de VC foram maiores nos grupos F30 e V30 comparados ao C30 ($p < 0,05$).

Grupos tratados por 60 dias

A Tabela 3 mostra os valores das médias, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas de acordo com os grupos tratados por 60 dias (C60, PILO, FS60, VS60, FP60 e VP60).

Houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos tratados por 60 dias para as variáveis VC, FSE e C ($p < 0,05$).

Para FSE, houve diferença significativa entre os grupos PILO e VS60 ($p=0,0047$), PILO e FP60 ($p=0,0451$), VS60 e VP60 ($p=0,0214$). O menor valor médio do FSE foi no grupo VS60 e o maior no grupo PILO.

Houve diferença significativa para C entre os grupos PILO e FP60 ($p=0,0009$), FS60 e FP60 ($p=0,0006$), FS60 e C60 ($p=0,0258$), VS60 e FP60 ($p=0,0000$), VP60 e FP60 ($p=0,0025$), FP60 e C60 ($p=0,0156$). O maior valor médio de C foi no grupo FS60 e o menor foi no grupo FP60.

Para VC, o grupo PILO obteve o menor valor médio e o grupo VP60, o maior valor médio ($p<0,05$).

As Figuras 1-4 ilustram fotomicrografias de glândulas parótidas de ratos de grupos controles e experimentais.

Discussão

A ação anticolinérgica das drogas psicotrópicas ainda não está totalmente esclarecida. Várias são as sugestões sobre o papel farmacológico dos fármacos que agem no sistema nervoso central atuando sobre as glândulas salivares. As tentativas para esclarecer o efeito xerostômico destes fármacos possuem grande valor científico, tanto para elucidar o efeito fisiofarmacológico, como também para acrescentar benefícios aos pacientes usuários destes fármacos.

O uso crônico de fluoxetina e venlafaxina por 30 dias provocou redução do FSE em ratos, aumento do VC e aumento do número de células mioepiteliais. A venlafaxina foi ainda responsável pelo aumento da proliferação de células acinares e ductais nas glândulas parótidas.

Quando administrada em associação com a venlafaxina durante 60 dias, a pilocarpina foi capaz de restabelecer o FSE normal de ratos. O número de

células mioepiteliais manteve-se estável nas glândulas parótidas de ratos tratados durante 60 dias com venlafaxina associada a salina e a pilocarpina. Quando administrada em associação com a fluoxetina durante 60 dias, a pilocarpina não alterou o FSE e provocou uma severa diminuição do número de células mioepiteliais de glândulas parótidas de ratos.

O tratamento crônico com fluoxetina e venlafaxina durante 30 e 60 dias provocou redução do FSE de ratos. Nos grupos tratados por 30 dias, a redução do FSE foi mais intensa do que nos grupos tratados por 60 dias. Nestes, apesar de existir redução do FSE (FS60 - 0,036 mL/min e VS60 - 0,020 mL/min) quando comparados ao grupo controle (0,052 mL/min), a utilização crônica dos medicamentos não foi responsável por alterações estatísticas significativas do FSE. Diante desses resultados, três pontos principais devem ser discutidos: os mecanismos de ação da medicação sobre o sistema nervoso central, a adaptação fisiológica frente ao uso de psicotrópicos e a alteração de sensibilidade dos receptores no uso crônico dos psicofármacos.

A fluoxetina e a venlafaxina tem ação anticolinérgica de diferentes intensidades. A fluoxetina, por ser um inibidor seletivo da recaptação de serotonina, provoca maior disponibilidade de serotonina na fenda sináptica alterando a ligação da acetilcolina com os receptores muscarínicos (M3) presentes nas glândulas salivares e, assim, diminui a quantidade de saliva secretada. A venlafaxina é um antidepressivo atípico, atuando ora como inibidor da recaptação da serotonina, ora da noradrenalina, ou ainda de dopamina.¹¹ Não apresenta afinidade por receptores adrenérgicos α -1, receptores muscarínicos M3 ou histamínicos.¹ Conseqüentemente, sua ação torna-se imprevisível pela pluralidade de mediadores em que pode atuar,

variando desde diminuição da quantidade de saliva secretada até alterações na composição da saliva.^{13,21} A medicação antidepressiva parece não impedir a produção da saliva, mas interferir na ligação do mediador químico (acetilcolina) com o receptor (M3). Desta forma, a saliva seria produzida, mas não conseguiria ser excretada.¹² O aumento do VC das glândulas parótidas de ratos que receberam antidepressivos por 30 dias (grupos F30 e V30) comparados ao grupo controle (C30) representa uma hipertrofia de células acinares e ductais e reforça esta afirmação. A hipertrofia de células serosas, caracterizada por um alargamento das células acinares e acúmulo de grânulos de secreção, já foi relatada anteriormente em uso crônico de psicotrópicos.^{12,26}

O presente estudo comprovou o efeito anticolinérgico da fluoxetina e da venlafaxina quando administradas de forma crônica durante 30 dias. Quando o tratamento estendeu-se por 60 dias, a redução do FSE não foi significativa comparada ao controle. Sabe-se que a utilização prolongada de drogas psicotrópicas é responsável por alteração na sensibilidade de receptores.²⁷ Os efeitos terapêuticos e colaterais de uma droga diminuem gradualmente quando administrada de modo contínuo ou repetidamente, podendo ocasionar dessensibilização, resistência ou tolerância à droga. A adaptação fisiológica também pode ocorrer, assim é comum observar que muitos efeitos colaterais de fármacos tendem a diminuir com o tempo de administração, apesar do uso contínuo da droga.²⁷ De tal modo sugere-se que a redução mais branda do FSE em ratos tratados durante 60 dias pode ser decorrente dos efeitos de tolerância ou de adaptabilidade dos psicotrópicos.

A ausência de diferença significativa no FSE entre os grupos C60, FS60 e VS60 sugere que houve um restabelecimento do FSE normal dos ratos 30

dias após a suspensão da medicação (Tabela 3). No entanto, estes dados devem ser analisados com cautela, uma vez que a redução de FSE de mais de 50% traz conseqüências clínicas deletérias relevantes (C60 – 0,052 mL/min; VS60 – 0,020 mL/min).

A diminuição do FSE em ratos sob tratamento crônico com fluoxetina ainda pode ser conseqüência indireta da ação da serotonina nos receptores 5HT presentes na microcirculação periférica. Pelo fato da fluoxetina aumentar a disponibilidade de serotonina, esta pode se ligar aos receptores 5HT alterando o fluxo sanguíneo das glândulas salivares e, conseqüentemente, a quantidade e a composição do fluxo salivar.²⁸

No presente estudo, a pilocarpina apresentou efeito secretagogo significativo, comprovando sua capacidade agonista colinérgica, corroborando os achados de Davies & Shorthose.²⁹ A pilocarpina ocasionou um aumento do FSE, mostrando-se eficiente no tratamento da hipossalivação provocada pela venlafaxina (grupos VS60 e VP60). Por outro lado, quando a pilocarpina foi associada a fluoxetina (grupo FP60), não houve aumento do FSE quando comparado ao grupo que não recebeu pilocarpina (grupo FS60 – Tabela 3). A pilocarpina é um agente parassimpatomimético que age como agonista dos receptores muscarínicos de modo não-seletivo, com atividade β -adrenérgica e excreção renal.^{30,31} Desta maneira, a pilocarpina promove estimulação das glândulas exócrinas e, conseqüentemente, secreção salivar, sendo eficiente nos pacientes sem destruição grave do parênquima glandular.³⁰

No presente estudo, tanto a fluoxetina como a venlafaxina, quando administradas durante 30 dias, provocaram aumento do número de células mioepiteliais nas glândulas parótidas de ratos. Estes resultados são contrários

às considerações de Grégio et al.,¹² que sugeriram uma possível diminuição do número de células mioepiteliais para explicar a hipossalivação e a hipertrofia de células mucosas observados no tratamento crônico de ratos com benzodiazepínico e antidepressivo. Vale especular que, numa atividade compensatória do déficit de saliva, o organismo, na tentativa de aumentar a atividade das células mioepiteliais para expulsar a saliva retida, induziria um aumento do número destas células, para que elas, em sua função de contratilidade, auxiliassem a liberação da saliva retida. As células mioepiteliais aceleram o fluxo de saída inicial da saliva, promovendo um efeito de ordenha de qualquer fluido extracelular adjacente. Os dendritos das células mioepiteliais dobram-se ao redor do sistema de ductos e servem para comprimir as células acinares e ductais.^{16,17}

As células parenquimatosas (acinares, mioepiteliais e ductais) possuem potencial proliferativo de manutenção e regeneração da população celular parenquimatosa adulta em glândulas normais e capacidade proliferativa quando submetidas a injúrias físicas, tais como, obstrução ductal.^{19,32,33}

Na literatura, não há estudos imunoistoquímicos sobre o comportamento das células mioepiteliais, acinares e ductais frente à utilização de psicofármacos. Há relatos de estudos imunoistoquímicos sobre a capacidade proliferativa das células parenquimatosas em atrofia glandular induzida.^{19,22,23,33} Uma análise comparativa entre o presente trabalho e os estudos sobre atrofia glandular induzida pode ser estabelecida. No modelo animal, em que foi provocada a atrofia do ducto principal da glândula parótida, mesmo após a atrofia induzida, a glândula continuou a produzir saliva, no entanto, esta saliva não era excretada por causa da obstrução mecânica (física) do ducto excretor

principal. No modelo animal tratado cronicamente com antidepressivos, sugerimos que a saliva continua a ser produzida, mas devido a interferências neuroquímicas dos psicotrópicos, ela não é secretada. Em ambos os modelos animais submetidos a injúrias (físicas e neuroquímicas), houve aumento significativo do número de células mioepiteliais.^{22,23,33}

Quando o comportamento das células mioepiteliais foi analisado nos grupos tratados durante 60 dias, houve uma diminuição severa do número de células mioepiteliais no grupo tratado com fluoxetina e pilocarpina (FP60) e uma semelhança no número de células mioepiteliais no grupo tratado com venlafaxina e pilocarpina (VP60) comparados ao controle (C60 – Tabela 3). Isto pode ter sido consequência de um sinergismo farmacológico ou de uma interação farmacodinâmica entre fluoxetina e pilocarpina, e venlafaxina e pilocarpina. É sabido que as diferentes classes de antidepressivos apresentam efeitos anticolinérgicos em graus variados³⁴ e que a associação de duas drogas pode resultar em sinergismo farmacológico, em que o efeito combinado das duas substâncias mostra-se maior que a soma de cada um isoladamente.³⁵ Por outro lado, as interações farmacodinâmicas resultam da ação dos fármacos envolvidos no mesmo receptor. Um fármaco pode aumentar o efeito do agonista por estimular a receptividade de seu receptor celular ou inibir enzimas que o inativam no local de ação. A diminuição de efeito pode dever-se à competição pelo mesmo receptor, tendo o antagonista maior afinidade.³⁵

Uma vez que a calponina não é um marcador de proliferação celular, o presente estudo determinou o índice numérico das células marcadas positivamente para a calponina, a qual identifica especificamente as células mioepiteliais no parênquima glandular. Pela metodologia empregada, não foi

possível inferir diretamente a proliferação celular, mas é possível sugerir que exista alteração na taxa de proliferação de células mioepiteliais nos grupos estudados.

Neste estudo, para os grupos tratados durante 30 dias, a venlafaxina (grupo V30) foi capaz de induzir aumento na proliferação de células acinares e ductais comparado à salina (grupo controle). Na tentativa de compensar a redução significativa do FSE no uso crônico de venlafaxina (V30), é possível que ocorressem mitoses para a formação de novos ácinos e ductos (Tabela 2). A intensa capacidade proliferativa das células acinares e ductais já foi relatada em trabalhos com atrofia glandular induzida por obstrução.¹⁹ Além disso, o grupo V30 apresentou o mais alto valor médio de VC, diferente do grupo controle (C30), sugerindo a presença de hipertrofia celular. Vale ressaltar que para cada célula há um tamanho crítico acima do qual o estímulo para hipertrofia deixa de provocar reações adaptativas e a célula entra em mitose para compensar o excesso de citoplasma.³⁶ Acreditamos que a intensa capacidade proliferativa das células acinares e ductais e a presença de hipertrofia celular tenham contribuído para o aumento do número médio de células marcadas pelo PCNA no grupo V30.

Para os grupos tratados durante 60 dias, não houve diferença significativa para o PCNA. De uma maneira geral, os antidepressivos não ocasionaram agressões significativas em células acinares e ductais. Acredita-se que o potencial proliferativo observado nestas células faz parte da manutenção e regeneração da população celular parenquimatosa adulta.

Os modelos experimentais em ratos apresentam algumas limitações; no entanto, a simulação de doenças e/ou terapêutica em modelos animais é de

grande importância para se tentar estabelecer o prognóstico das doenças e analisar os efeitos colaterais de fármacos.

Conclusão

A utilização crônica da fluoxetina e da venlafaxina durante 30 dias mostrou-se capaz de induzir aumento do número de células mioepiteliais em glândulas parótidas de ratos. A venlafaxina administrada durante 30 dias provocou aumento da proliferação de células acinares e ductais. A venlafaxina, a fluoxetina e a pilocarpina não provocaram alterações na proliferação de células acinares e ductais quando administradas por 60 dias.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Este trabalho teve auxílio financeiro do CNPq (processo 474790/2004-5).

Referências

1. Moreno RA, Moreno D, Soares MBM. Psicofarmacologia dos antidepressivos. Rev Bras Psiquiatr [ISSN 1516-4446].2002 mai[2003 Jun 27]; 21(1): [24-40p.]. Available from: <http://www.scielo.br/cgi-bin/wxix.exe/iah/>
2. Sansone RA, Sansone LA. Pain, pain, go away: antidepressants and pain management. Psychiatry (Edgmont) 2008;5:16-9.
3. Cusack B, Nelson A, Richelson E. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. Psychopharmacology (Berl) 1994;114:559-65.
4. Dhir A, Kulkarni SK. Antidepressant-like effect of 17 beta-estradiol: involvement of dopaminergic, serotonergic, and (or) sigma-1 receptor systems. Can J Physiol Pharmacol 2008;86:726-35.
5. Spina E, Santoro V, D'Arrigo C. Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update. Clin Ther 2008;30:1206-27.
6. Stahl SM. Psychopharmacology of antidepressants. London: Martin Dunitz;1997.p. 114.
7. Cipriani A, Brambilla P, Furukawa TA, Geddes J, Gregis M, Hotopf M, et al. Fluoxetine versus other types of pharmacotherapy for depression. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library 2006;3.
8. Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993;75:186-91.

9. Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis* 2003;9:165-76.
10. Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 2003;134:61-9.
11. Keene JJ Jr, Galasko GT, Land MF. Antidepressant use in psychiatry and medicine: importance for dental practice. *J Am Dent Assoc* 2003;134:71-9.
12. Grégio AMT, Durscki JRC, Lima AAS, Machado MAN, Ignácio SA, Azevedo LR. Association of amitriptyline and diazepam on the histomorphometry of rat parotid glands. *Pharmacologyonline* 2006;2:96-108.
13. de Almeida P del V, Grégio AM, Brancher JA, Ignácio SA, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Effects of antidepressants and benzodiazepines on stimulated salivary flow rate and biochemistry composition of the saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:58-65.
14. ZacliKevis MV, D'Agulham AC, Bertassoni LE, Machado MA, de Lima AA, Grégio AM, Azevedo-Alanis, LR. Effects of benzodiazepine and pilocarpine on rat parotid glands: histomorphometric and sialometric study. *Med Chem* 2009;5:74-8.
15. da Silva S, de Azevedo LR, de Lima AA, Ignácio SA, Machado MA, ZacliKevis MV, Grégio AM. Effects of fluoxetine and venlafaxine and pilocarpine on rat parotid glands. *Med Chem* 2009;5:483-90.

16. Klein RM. Development, structure and function of the salivary glands. In: Avery JK. Oral development and histology. USA: New York; 2001.p.292-331.
17. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, embryology and histology. Chicago: Mosby; 2002 p.255-67.
18. Zarbo RJ, Prasad AR, Regezi JA, Gown AM, Savera AT. Salivary gland basal cell and canalicular adenomas: immunohistochemical demonstration of myoepithelial cell participation and morphogenetic considerations. Arch Pathol Lab Med 2000;124:401-5.
19. Burford-Mason AP, Cummins MM, Brown DH, MacKay AJ, Dardick I. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. J Oral Pathol Med 1993;22:440-6.
20. Norberg L, Dardick I, Burford-Mason AP. Differentiating myoepithelial and acinar cells in rat neonatal parotid gland and histogenetic concepts for salivary gland tumors. J Oral Pathol Med 1996;25:474-80.
21. 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;23:568-75.
22. Takahashi S, Schoch S, Walker NI. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. Int J Exp Pathol 1998;79:293-301.
23. Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford–Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat

- parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:674-80.
24. Rocha RM, Andrade VP, Nunes CB, Rocha GFS, Sanches FSF, Oliveira FS et al. Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:477-82.
25. Schuler S, Gurmini J, Cecílio WA, Viola de Azevedo ML, Olandoski M, de Noronha L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008;32:184-9.
26. Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol* 1989;13:879-99.
27. Gorenstein C, Scavone C. Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. *Rev Bras Psiquiatr* 1999;2:64-73.
28. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Pharmacology*. London: Churchill Livingstone: 2007; p.557-74.
29. Davies AN, Shorthose K. Parasympathomimetic drugs for the treatment of salivary gland dysfunction due to radiotherapy. *Cochrane Database Syst Ver* 2007;18:19.
30. Grisius MM. Salivary gland dysfunction: a review of systemic therapies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:156-62.
31. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:535-43.
32. Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Biol Med* 1997;8:51-75.

33. Miguel MC, Andrade ES, Taga R, Pinto LP, Souza LB. Hyperplasia of myoepithelial cells expressing calponin during atrophy of the rat parotid gland induced by duct ligation. *Histochem J* 2002;34:499-506.
34. Wynn RL, Meiller TF. Drugs and dry mouth. *Gen Dent* 2001;49:10-2,14.
35. Craig CR. Introduction to central nervous system pharmacology. In: Craig CR, Stitzel RE (editors). *Modern pharmacology with clinical applications*. 5th ed. Boston: Little Brown; 1997, p.293-302.
36. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1999;p.336.

Tabela 1 - Divisão dos grupos controles e experimentais de acordo com a medicação, período de tratamento, dose e via de administração.

Grupos	N	Fármaco	Período de tratamento	Dose	Via de Administração
1- C30	10	Salina	1-30 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
2- C60	10	Salina	1-60 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
3- PILO	10	Pilocarpina ¹	1-60 dias	0,05 mL	Tópica
4- F30	10	Fluoxetina ²	1-30 dias	20 mg/kg	Intramuscular
5- V30	10	Venlafaxina ³	1-30 dias	40 mg/kg	Intramuscular
6- FS60	10	Fluoxetina	1-30 dias	20 mg/kg	Intramuscular
		Salina	31-60 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
7- VS60	10	Venlafaxina	1-30 dias	40 mg/kg	Intramuscular
		Salina	31-60 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
8- FP60	10	Fluoxetina	1-30 dias	20 mg/kg	Intramuscular
		Fluoxetina + Pilocarpina	31-60 dias	20 mg/kg e 0,05 mL	Intramuscular e Tópica
9- VP60	10	Venlafaxina	1-30 dias	40 mg/kg	Intramuscular
		Venlafaxina + Pilocarpina	31-60 dias	40 mg/kg e 0,05 mL	Intramuscular e Tópica

N: tamanho da amostra

¹: Gel em ora base preparado com 1% de hidrocloreto de pilocarpina (Gerbras Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil)

²: Solução injetável de Fluoxetina (lote 20040625, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil)

³: Solução injetável de Venlafaxina (lote D/VN/002/02, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil)

Tabela 2 – Valores médios, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas segundo os grupos tratados por 30 dias com salina (C30), fluoxetina (F30) e venlafaxina (V30).

Grupos	C30		F30		V30		Valor p
	X	DP	X	DP	X	DP	
FSE (mL/min) ^δ	0,051 ± 0,026 ^{a,b}		0,014 ± 0,006 ^a		0,026 ± 0,022 ^b		0,001*
VC (mm ³) ^δ	6965,683 ± 3792,951 ^{ab}		10384,311 ± 4869,539 ^a		11945,927 ± 7891,179 ^b		0,000*
PCNA	55,8 ± 14,382 ^a		59,4 ± 16,900 ^b		89,5 ± 16,400 ^{a,b}		0,000*
C	13,9 ± 2,644 ^{a,b}		20 ± 4,216 ^a		19,8 ± 5,007 ^b		0,003*

^δ: Valores obtidos do trabalho de Da Silva et al (2009)¹⁵

FSE (mL/min): Fluxo salivar estimulado em mililitros por minuto

VC (mm³): Volume celular em milímetros cúbicos

PCNA: Anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular

C: Anticorpo contra antígeno calponina

X: média

DP: desvio padrão

p: valor p de ANOVA

Letras iguais representam diferença estatística significativa entre grupos.

* diferença estatística (p<0,05)

Tabela 3 – Valores médios, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas segundo os grupos tratados com pilocarpina (PILO), salina (C60), fluoxetina e salina (FS60), venlafaxina e salina (VS60), fluoxetina associada a pilocarpina (FP60) e venlafaxina associada a pilocarpina (VP60).

Grupos	C60		PILO		FS60		VS60		FP60		VP60		Valor p
	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	
FSE(mL/min) ^δ	0,052 ± 0,029		0,067 ± 0,028 ^{a,b}		0,036 ± 0,017		0,020 ± 0,004 ^{a,c}		0,034 ± 0,014 ^b		0,055 ± 0,026 ^c		0,000*
VC (mm ³) ^δ	6505,564±		5825,418 ±		6809,347 ±		7525,112 ±		7519,797 ±		10194,315 ±		0,000*
	3343,475 ^d		1968,070 ^{ab}		3189,246 ^e		3196,085 ^{ac}		4272,808 ^f		4456,345 ^{bodef}		
PCNA	50 ± 17,531		46,8 ± 13,506		36,7 ± 16,687		52,5 ± 18,710		52 ± 17,153		43,6 ± 18,007		0,296 ^{ns}
C	13,6 ± 4,789 ^{c,f}		22,1 ± 7,385 ^a		24,2 ± 7,955 ^{b,c}		19,7 ± 4,322 ^d		7 ± 1,563 ^{a,b,d,e,f}		18,2 ± 6,250 ^e		0,000*

^δ: Valores obtidos do trabalho de Da Silva et al (2009)¹⁵

FSE (mL/min.): Fluxo salivar estimulado em mililitros por minuto

VC: Volume celular em milímetros cúbicos

PCNA: Anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular

C: Anticorpo contra antígeno calponina

X: média

DP: desvio padrão

p: valor p de ANOVA

Letras iguais representam diferença estatística significativa entre grupos.

* diferença estatística (p<0,05)

^{ns} - não significante

FIGURAS

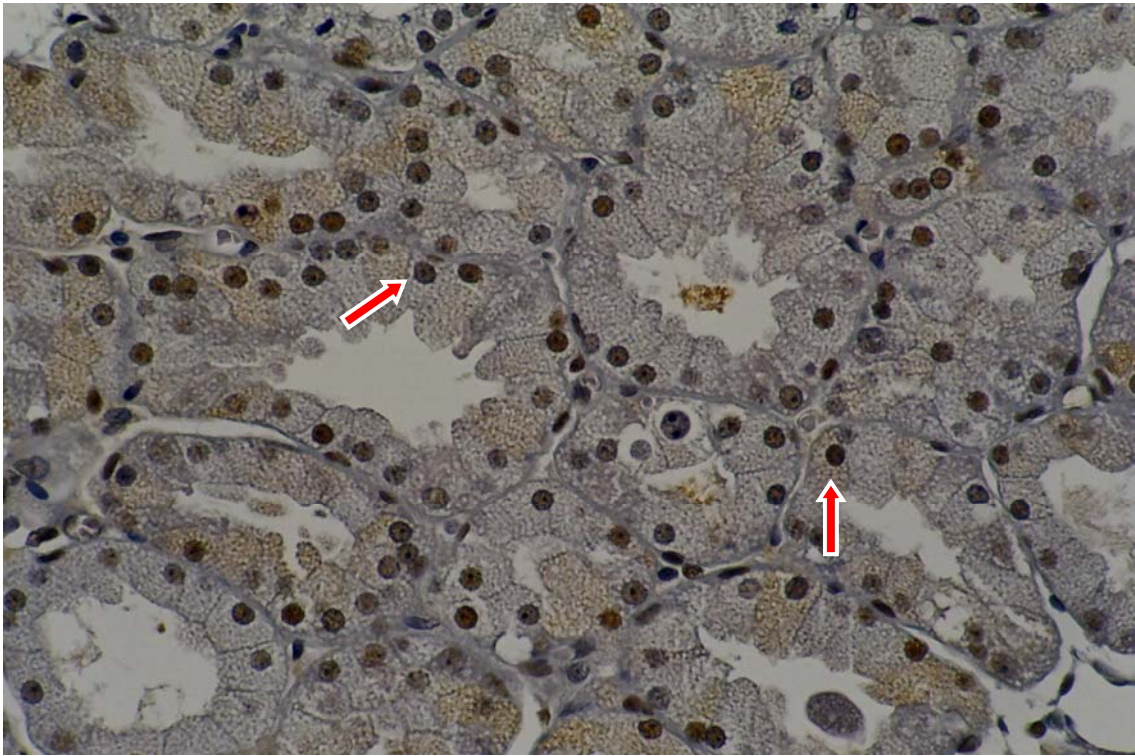


Figura 1

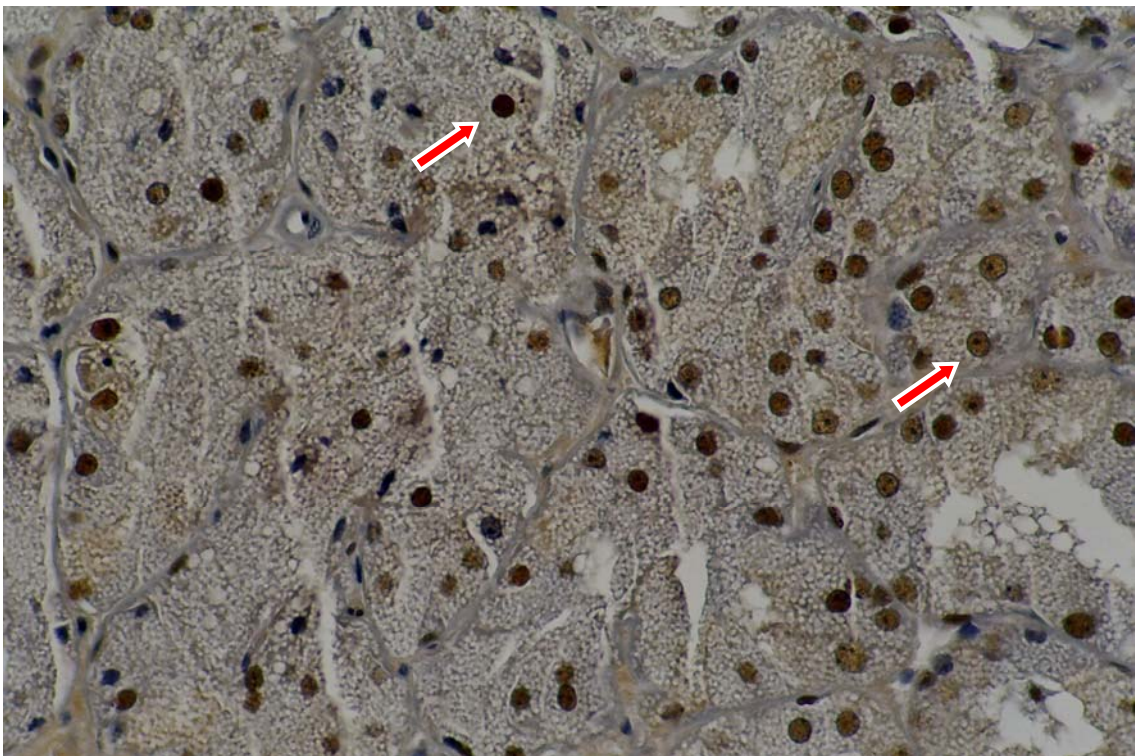


Figura 2

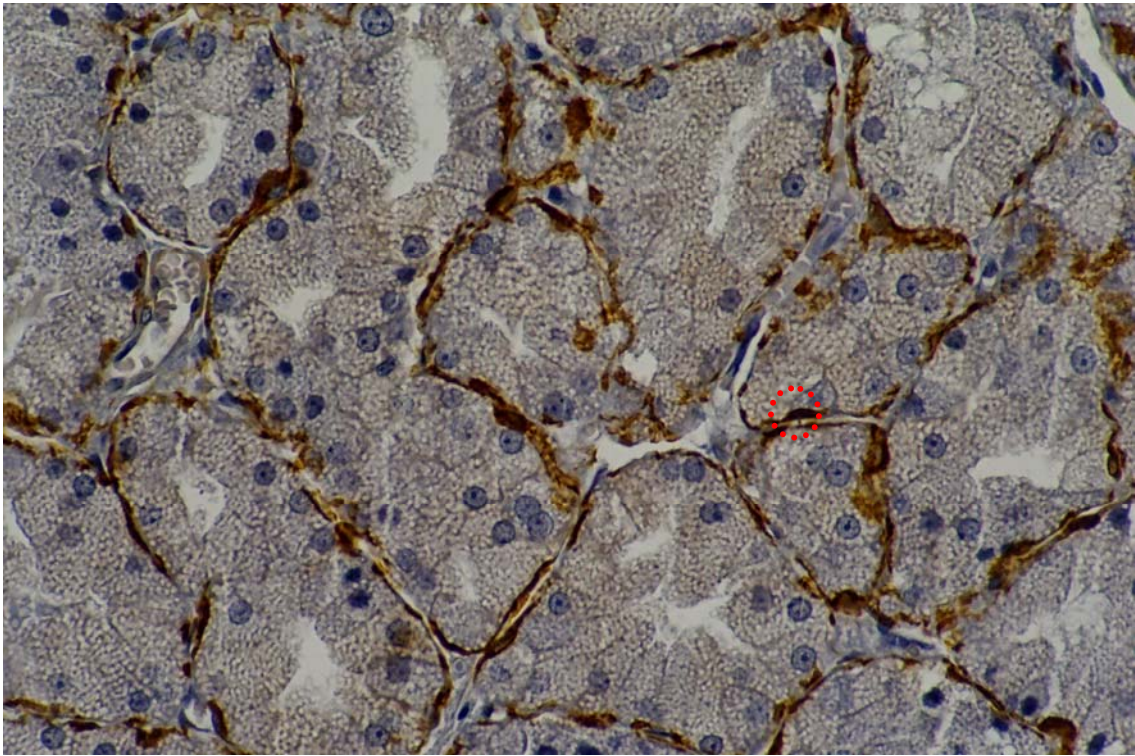


Figura 3

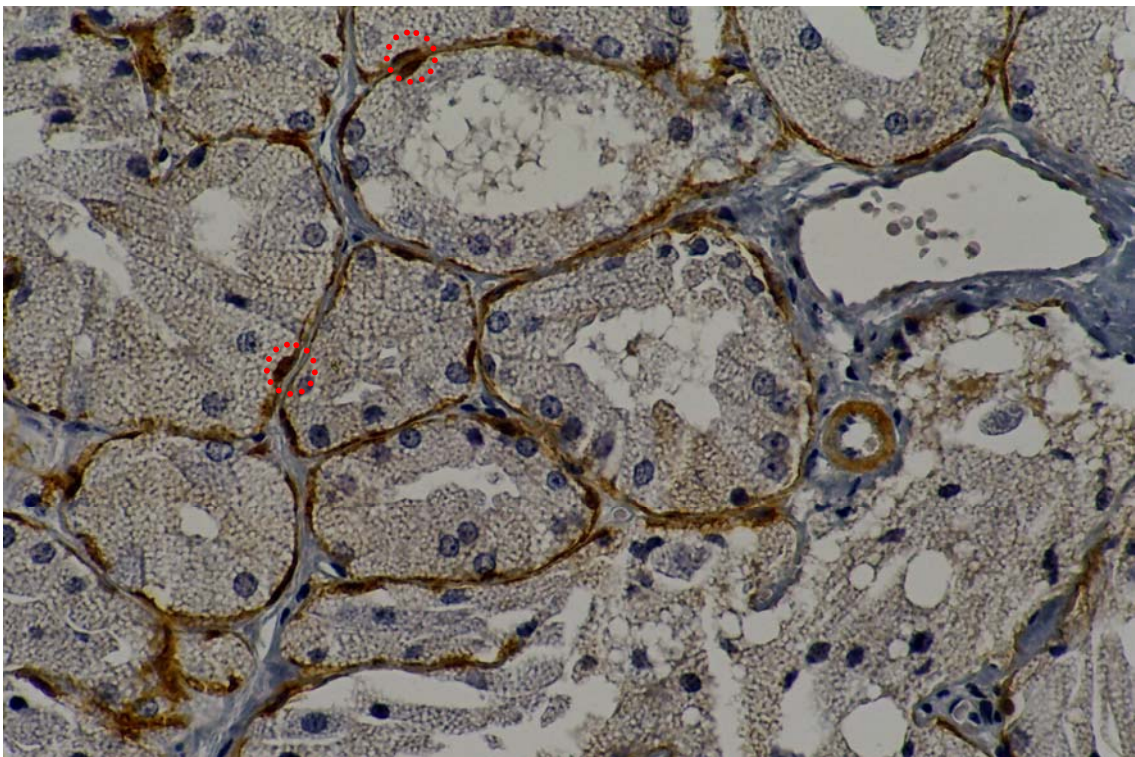


Figura 4

Legenda das figuras

Figura 1: Parênquima de glândula parótida de rato exibindo núcleos de células acinares marcados com o anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). (Grupo FP60; aumento original 400 X)

Figura 2: Parênquima de glândula parótida de rato mostrando desorganização e núcleos de células acinares marcados com anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). (Grupo VP60; aumento original 400 X)

Figura 3: Parênquima normal de glândula parótida de rato exibindo células mioepiteliais marcadas pelo anticorpo contra o antígeno calponina ao redor dos ácinos. (Grupo C30, aumento original 400 X)

Figura 4: Parênquima de glândula parótida de rato mostrando positividade de células mioepiteliais para o anticorpo contra o antígeno calponina, dispostas na periferia dos ácinos. (Grupo V30, aumento original 400 X)

3. Artigo 1A. Versão Inglês

Effects of antidepressants and pilocarpine on rat parotid glands. Immunohistochemical study.

Title: Effects of antidepressants and pilocarpine on rat parotid glands. Immunohistochemical study.*

Tatiana Maria Folador Mattioli, DDS, MSc^a, Silvana da Silva, DDS, MSc^a, Ana Maria Trindade Grégio, PharmB, PhD^b, Maria Ângela Naval Machado, DDS, PhD^b, Paula Cristina Trevilatto, DDS, PhD^b, Luciana Reis Azevedo-Alanis, DDS, PhD^c

^a Post-graduate student, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^b Titular professor, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^c Adjunct professor, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Corresponding author:

Luciana Reis Azevedo-Alanis

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Pós-graduação em Odontologia

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho 80215-901

Curitiba, Paraná, Brazil

Phone: +55 (41) 3271-2592

Fax: +55 (41) 3271-1405

l.azevedo@pucpr.br

* Article formatted according to the requirements of the journal *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* (anexx 3).

Abstract

Objectives: To evaluate the effects of antidepressants and pilocarpine on the behavior of myoepithelial, acinar and ductal cells on rat parotid glands.

Study design: Ninety male Wistar rats were allocated to nine groups. Control groups received saline during 30 (C30) and 60 days (C60), and pilocarpine (PILO) during 60 days. Experimental groups were dealt with fluoxetine (F30) and venlafaxine (V30) during 30 days; fluoxetine (FS60) and venlafaxine (VS60) associated with saline during 60 days; and fluoxetine (FP60) and venlafaxine (VP60) associated with pilocarpine during 60 days. Parotid glands specimens were processed. The immunohistochemical expression of calponin and PCNA on myoepithelial and parenchymal cells, respectively, was evaluated. ANOVA, Tukey HSD and Games-Howell tests were applied to detect differences among the groups ($p < 0.05$).

Results: Antidepressants chronic use during 30 days induced an increase in the number of positive staining cells for calponin compared with controls ($p < 0.05$). Venlafaxine used during 30 days (V30) induced an increase in the number of positive staining cells for PCNA. Fluoxetine and pilocarpine (FP60) induced a significant decrease in the number of positive staining cells for calponin compared with all groups ($p < 0.05$).

Conclusions: Chronic use of venlafaxine and fluoxetine during 30 days induced an increase in the number of positive staining cells for calponin. Venlafaxine, fluoxetine and pilocarpine did not induce changes in the proliferation of acinar and ductal cells in rat parotid glands treated during 60 days.

Key Words

Antidepressants; immunohistochemistry; parotid salivary glands

Introduction

The current generation of antidepressants is composed by drugs which act in only one neurotransmitter, such as the serotonin (fluoxetine) or the noradrenaline (reboxetine) selective reuptake inhibitors, or they act in multiple neurotransmitters (venlafaxine), without targeting other cerebral receptors not related with depression, such as histamine and acetylcholine.¹⁻³ Venlafaxine is a serotonin and noradrenalin selective reuptake inhibitor, and it exerts a weak activity as a dopamine selective reuptake inhibitor, which is of clinical significance only in high doses.^{1,4,5} The current antidepressants differ from the classic tricyclic antidepressants and from the monoaminoxidase inhibitors, irreversible due to pharmacological selectivity, modifying and lessening side effects.⁶

In a Cochrane systematic review (1966-2004), the adverse effects of fluoxetine (dry mouth sensation, dizziness and sudoresis) were compared with the adverse effects of the most recent antidepressants (venlafaxine, reboxetine, phenelzine, nefazodone) and they have shown to be less pronounced than in the latter.⁷

Hyposalivation, xerostomia and alterations in the saliva composition are important side effects related to the use of psychotropic medication, including the antidepressants.⁸⁻¹⁴ The mechanism in which these side effects take place has still not been completely clarified; however, histomorphometric and gravimetric studies have been contributing to a better understanding of the cytotoxic effects of psychotropic drugs on the salivary glands.¹²⁻¹⁵

Grégio et al. 2006,¹² when studying the effects of the chronic use of the association of a benzodiazepinic (Diazepam[®]) and an antidepressant

(Tryptanol[®]) on parotid glands of rats, could observe hyposalivation and hypertrophy of serous cells, which suggested a possible inhibition of the activity of the myoepithelial cells, originating from nervous stimulation, a decrease in the number of such cells with the chronic use of psychotropic drugs, or an alteration in the number of acinar and ductal cells.¹²

The myoepithelial cells, located between the basal lamina and the plasmatic membrane in acinar cells and intercalated ducts, are non-muscular cells that exert contractile functions, contributing to empty the secretion from the secretory units and from the ducts.^{16,17} Calponin is a protein located in myoepithelial cells that is involved in the regulatory system of smooth muscles contraction.¹⁸ Acinar and ductal cells are epithelial cells with proliferative potential for maintenance and regeneration.¹⁹⁻²³

The aim of this study was to evaluate the behavior of myoepithelial, acinar and ductal cells of parotid glands of rats treated with fluoxetine and venlafaxine, through immunoreactions with calponin and anti-proliferating cell nuclear anti-antigen.

Methods

This study was approved by the Research Ethics Committee at Universidade Tuiuti do Paraná (CEP-UTP n. 55/2003).

The sample was composed of parotid glands from male Wistar rats, *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *mammalian*, with an approximate weight of 250 g, included in paraffin blocks from Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Ninety animals were allocated to nine groups, each group composed of 10 animals. The animals received different treatments, as described on Table 1.¹⁵

Each *tissue microarray* (TMA) contained 10 samples which ones have 3 mm of diameter^{24,25} of parotid glands.

The slides were manufactured with 4 µm thickness cuts, and thereafter underwent the immunohistochemistry process.

For immunohistochemical, anti-calponin and anti-proliferating cell nuclear anti-antigen were used. Both antibodies were diluted (DakoCytomation®; Dako North America, Carpinteria, CA, USA). The secondary antibody was EnVision®+Dual Link/Peroxydase (DakoCytomation®; Dako North America, Carpinteria, CA, USA) and to reveal the antigen-antibodies reactions, DAB substrate-chromogen system (DakoCytomation®; Dako North America, Carpinteria, CA, USA) was used. The slides were counter-stained with Harris hematoxylin.

For myoepithelial cell staining, the monoclonal antibody anti-calponin (C) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) was used. The immunoreactions with C used antibody dilution in 1:800. For acinar and ductal cells in proliferation staining, the anti-proliferating cell nuclear anti-antigen – PCNA was used (Dako®). PCNA is a monoclonal antibody that allows the study of cell kinetic. The immunoreactions with PCNA used antibody dilution in 1:400.

The reading of the slides was carried out in a Olympus® BX50 optical microscope (Olympus Corporation, Ishikawa, Japan), using 40X objective, by only one examiner (T.M.F.M.). The immunohistochemical expression of C in myoepithelial cells and of PCNA in acinar and ductal cells was analyzed by means of interpreting images from 24 histological fields, equivalent to the entire TMA area.

All the specimens showed positive staining cells for antibody C, considering positive the cell that exhibited any expression for C in the glandular epithelium, represented by a brownish staining, independently from the intensity of the staining, and enough to differentiate between positive and negative cells.

The presence or absence of PCNA antibody staining was evaluated. Cells which exhibited any expression for PCNA in the glandular epithelium were considered positive, represented by a brownish staining, regardless of staining intensity.

It was considered that in each TMA there were 24 histological fields. Previous to counting the number of staining cells for the antibodies, it was verified how many fields out of 24 could be evaluated. Therefore, the integrity and quality of the tissue, and the presence of technical artifacts were taken in consideration. After evaluating the 24 histological fields of all TMA, the numeric indexes for the positive staining cells for C and for PCNA were obtained.

To determine the average value of staining cells for C and PCNA from each TMA, the following calculation was made: the average value of staining cells in a TMA was represented by the sum of the number of staining cells for the antibody in each evaluated field, divided by the number of evaluated fields. After obtaining the average value for each TMA, they were added and divided by 10 (equivalent to the total amount of TMA) and thus, the average value of staining cells for each group was obtained.

Besides the C and PCNA variables, this study also used the average values for stimulated salivary flow rate (SSFR) and cellular volume (CV), obtained from the study by Da Silva et al. (2009).¹⁵ Because both investigations

studied the same sample, the SSFR and CV findings were compared with immunohistochemical staining results from C and PCNA.

Statistical Analysis

The data were analysed using SPSS software version 15.0 for Windows. Normality analysis was performed using the Kolmogorov-Smirnov test, and the Levene test was used to analyse variance homogeneity.

For the groups presenting a normal distribution, the Anova test at 01 criterion was performed. When the Anova at 01 criterion showed difference among the average numbers of the groups and treatment, the Tukey HSD multiple comparison test was used for the variables which presented variance homogeneity among the groups. For the variables which did not present variance homogeneity, the Games-Howell test was used.

The level of significance for all the statistical tests was set at 5 % ($p < 0.05$).

Results

Three out of nine groups evaluated (C30, F30, V30) were treated during 30 days, whereas the other six groups (C60, PILO, FS60, VS60, FP60, VP60) were treated for 60 days. The studied variables were anti-calponin (C) and anti-proliferating cell nuclear anti-antigen (PCNA) expression, which were compared with the CV and SSFR variables.¹⁵

Groups treated for 30 days

Table 2 shows average values, standard deviation and the p value for the studied variables according to the groups treated for 30 days (C30, F30 and V30). There were significant differences among the groups treated for 30 days for the SSFR, CV, PCNA and C variables ($p < 0.05$).

For SSFR, there was statistical significant difference between groups C30 and F30 ($p=0.0007$), and C30 and V30 ($p=0.0250$). C30 showed the highest SSFR mean value when compared with F30 and V30.

For C, there was significant difference between groups C30 and F30 ($p=0.0066$), and C30 and V30 ($p=0.0086$). The highest average values for C could be observed in F30 and V30 compared with C30.

For PCNA, there was statistical significant difference between F30 and V30 ($p=0.0006$), and V30 and C30 ($p=0.0001$). The lowest average value for PCNA was found in group C30 and the highest in group V30.

The highest average values for CV were observed in groups F30 and V30 compared with C30 ($p<0.05$).

Groups treated for 60 days

Table 3 shows the average values, standard deviation and p value for the studied variables according to the groups treated for 60 days (C60, PILO, FS60, VS60, FP60 and VP60).

There were statistical significant differences among the groups treated for 60 days for the CV, SSFR and C ($p<0.05$) variables.

For SSFR, there were significant differences between PILO and VS60 ($p=0.0047$), PILO and FP60 ($p=0.0451$), VS60 and VP60 ($p=0.0214$). The lowest SSFR average value was found in VS60 and the highest in PILO.

There were significant differences for C between groups PILO and FP60 ($p=0.0009$), FS60 and FP60 ($p=0.0006$), FS60 and C60 ($p=0.0258$), VS60 and FP60 ($p=0.0000$), VP60 and FP60 ($p=0.0025$), FP60 and C60 ($p=0.0156$). The highest average value for C was found in group FS60 and the lowest in group FP60.

For CV, group PILO showed the lowest average value and group VP60 the highest ($p < 0.05$).

Figures 1-4 illustrate photomicrographs from rats parotid glands in experimental and control groups.

Discussion

The anticholinergic action of psychotropic drugs still has not been completely clarified. There are many suggestions about the pharmacological role of drugs which act on the central nervous system, having effects upon the salivary glands. The attempts to clarify the xerostomic effects of such drugs are of great scientific value, both to explain the physio-pharmacological effect and to bring additional benefits to patients using these drugs.

Chronic use of fluoxetine and venlafaxine during 30 days was associated with a decrease in SSFR, an increase in CV and an increase in the number of myoepithelial cells in rats. Venlafaxine was associated with an increase in acinar and ductal cell proliferation in the parotid glands.

When used with venlafaxine during 60 days, pilocarpine could reestablish a normal SSFR in rats. The number of myoepithelial cells remained stable in the parotid glands of rats treated during 60 days with venlafaxine associated either with salina or pilocarpine. When used in association with fluoxetine during 60 days, pilocarpine has not shown to induce changes in SSFR and was associated with a severe decrease in the number of myoepithelial cells of rats parotid glands.

Chronic treatment with fluoxetine and venlafaxine during 30 and 60 days was associated with a decrease in SSFR in rats. In the groups treated for 30 days, SSFR decrease was more intense than in the groups treated for 60 days.

In the latters, in spite of the SSFR decrease (FS60 – 0.036 mL/min and VS60 – 0.020 mL/min) when compared with the control group (0.052 mL/min), chronic use of medication was not associated with significant alterations of SSFR. Considering these results, three main points must be discussed: mechanisms of action of the medication on the central nervous system, physiological adaptation to the use of psychotropic medication and alteration in receptor sensitivity due to chronic use of medication.

Fluoxetine and venlafaxine have anticholinergic effects of different intensities. Because fluoxetine is a serotonin selective reuptake inhibitor, it may cause higher serotonin availability in the synaptic gap, altering the bond of acetylcholine to the muscarinic receptors (M3) present in the salivary glands. Thus, it may decrease the quantity of salivary secretion. Venlafaxine is an atypical antidepressant, acting as a selective reuptake inhibitor for serotonin, noradrenaline as well as dopamine.¹¹ It does not show affinity to α -1 adrenergic receptors, M3 muscarinic or histaminic receptors.¹ Consequently, its action becomes unpredictable due to the plurality of mediators in which it may act, ranging from a decrease in salivary secretion to alterations in salivary composition.^{13,21} Antidepressant medication does not seem to block saliva production, but to interfere in the bond of the chemical mediator (acetylcholine) with the receptor (M3). Thus, saliva would be produced, but it would not be excreted.¹² The increase in CV values in parotid glands of rats which received antidepressants for 30 days (groups F30 and V30) compared with the control group (C30) seems to represent acinar and ductal cell hypertrophy and reinforces that statement. Serous cell hypertrophy, characterized by widened

acinar cells and secretory granule accumulation, has been previously reported in chronic use of psychotropic drugs.^{12,26}

This study has shown the anticholinergic effect of fluoxetine and venlafaxine when used chronically during 30 days. With a 60-day treatment, SSFR reduction was not significant when compared with the control group. It is known that a prolonged use of psychotropics causes alteration in receptors sensitivity.²⁴ The therapeutic and side effects decrease gradually when used continuously or repeatedly, which may cause desensitization, resistance or tolerance to the drug. Physiological adaptation may also occur; therefore, it is common to observe that many side effects from drugs tend to diminish with time of use, in spite of the continuous use of the drug.²⁷ It is thus suggested that the least pronounced SSFR decrease in rats treated during 60 days may be consequence from tolerance or adaptability to psychotropic drugs.

The absence of significant difference of SSFR mean values among groups C60, FS60 and VS60 suggests that the normal SSFR of rats was reestablished 30 days after suspending the medication (Table 3). However, this data must be carefully analyzed since SSFR decrease higher than 50% brings relevant prejudicial consequences (C60 – 0.052 mL/min; VS60 – 0.020 mL/min).

SSFR reduction in rats undergoing chronic treatment with fluoxetine may still be an indirect consequence of serotonin action in the 5HT receptors present in peripheral microcirculation. Due to the fact that fluoxetine increases serotonin availability, the latter may bind to 5HT receptors, altering the blood flow in the salivary glands, and consequently the quantity and composition of the salivary flow.²⁸

In this study, pilocarpine exerted a significant secretagogue effect, showing its cholinergic agonist capacity, and corroborating the findings by Davies & Shorthose, 2007.²⁹ Pilocarpine was associated with an increase in SSFR, being efficient in the treatment of hyposalivation caused by venlafaxine (groups VS60 and VP60). Conversely, when pilocarpine was used in association with fluoxetine (group FP60), there was no SSFR increase when compared with the group which did not receive pilocarpine (group FS60 – Table 3). Pilocarpine is a parasympathomimetic agent which acts as an agonist to the muscarinic receptors in a non-selective manner, with β -adrenergic activity and renal excretion.^{30,31} Thus it promotes stimulation of the exocrine glands, and consequently, salivary secretion, being efficient for patients without extensive glandular parenchyma destruction.³⁰

In the present study, both fluoxetine and venlafaxine, when used during 30 days, were associated with myoepithelial cell increase in parotid glands of rats. These results contradict the suggestions by Grégio et al. (2006),¹² who suggested a possible decrease in the number of myoepithelial cells in order to explain the hyposalivation and serous cell hypertrophy observed in the chronic treatment of rats with benzodiazepinic and antidepressant.¹² It is worth speculating that, in a compensatory activity to the saliva deficit, the organism, in an attempt to increase myoepithelial cell activity to secrete the retained saliva, would induce an increase in the number of these cells, aiming that they, in their contractility function, would assist releasing the retained saliva. The myoepithelial cells accelerate the initial saliva emptying flow, promoting draining of any adjacent extracellular fluid. The dendrites of myoepithelial cells fold

around the duct system; their function is to compress the acinar and ductal cells.^{16,17}

The parenchymatous cells (acinar, myoepithelial and ductal) show a proliferative potential for maintenance and regeneration of the adult parenchymatous cell population in normal glands, and a proliferative capacity when submitted to physical injury, such as ductal obstruction.^{19,20,32,33}

There are no immunohistochemical studies about the behavior of myoepithelial, acinar and ductal cells regarding the use of psychotropics. There have been immunohistochemical studies on the proliferative capacity of parenchymatous cells in induced glandular atrophy.^{19,22,23,33} A comparative analysis between this study and the studies about induced glandular atrophy may be established. In the animal model in which the atrophy of the parotid gland main duct was caused, even after induced atrophy, the gland continued producing saliva. This saliva, however, was not excreted due to a physical obstruction in the main excretory duct. In the animal model treated chronically with antidepressants, we suggest that the saliva continues being produced, but due to neurochemical interferences from the psychotropic drugs, it is not secreted. In both animal models submitted to injuries (physical and neurochemical), there was a significant increase in the number of myoepithelial cells.^{22,23,33}

When the behavior of myoepithelial cells was analyzed for groups treated for 60 days, there was an intense decrease in the number myoepithelial cells in the group treated with fluoxetine and pilocarpine (FP60) and a similarity in the number of myoepithelial cells in the groups treated with venlafaxine and pilocarpine (VP60) compared with the control group (C60 – Table 3). This may

have been a consequence of a pharmacological synergism or of a pharmacodynamic interaction between fluoxetine and pilocarpine, and venlafaxine and pilocarpine. It is known that the different antidepressants classes have anticholinergic effects in various degrees³⁴ and that the association of two drugs may result in pharmacological synergism, in which the combined effects of the two substances are more pronounced than the two added separately.³⁵ Conversely, pharmacodynamic interaction results from the action of drugs in the same receptor. A drug may increase the effect of the agonist by stimulating the receptivity of its cellular receptor or by inhibiting enzymes that may inactivate it in the place of the effect. A decrease in the effect may be due to the competition for the same receptor, where the antagonist possesses a higher affinity.³⁵

Once calponin is not a cellular proliferation marker, this study determined the numeric index of positive staining cells for calponin, which specifically identifies the myoepithelial cells in the glandular parenchyma. Due to the methodology which was employed, it was not possible to directly infer the cell proliferation, but it is possible to suggest that there is an alteration in the myoepithelial cellular proliferation rate among the studied groups.

In this study, for the groups treated for 30 days, venlafaxine (group V30) seemed to induce an increase in acinar and ductal cell proliferation compared with saline (control group). In an attempt to compensate the significant SSFR reduction in the chronic use of venlafaxine (V30), it is possible that mitoses occurred in order to create new acini and ducts (Table 2). The intense proliferative capacity of acinar and ductal cells has already been reported in studies about glandular atrophy induced by obstruction.¹⁹ Moreover, group V30

showed the highest CV mean value, different from the control group (C30), suggesting the presence of cellular hypertrophy. It is worth emphasizing that there is a critical size for each cell, above which the stimulus for hypertrophy does not cause adaptative reactions and the cell goes through mitosis to compensate the excessive cytoplasm.³⁶ We believe that the proliferative capacity of the acinar and ductal cells and the presence of cellular hypertrophy contributed to the increase in the mean value of positive staining cells for PCNA in group V30.

For the groups that were treated during 60 days, there was not any significant difference for PCNA. Generally, antidepressants chronic use has not been associated with significant aggressions to acinar and ductal cells. We believe that the proliferative potential observed in these cells assists maintaining and regenerating the adult parenchymous cellular population.

The experimental models in rats show some limitations; however, disease and/or therapeutic simulation in animal models is of great importance in trying to translate disease prognoses and analyze side effects of drugs.

Conclusion

Chronic use of fluoxetine and venlafaxine during 30 days was associated with an increase in the number of positive staining cells for calponin in parotid glands of rats. Venlafaxine, when used during 30 days, was associated with an increase in the proliferation of acinar and ductal cells. Venlafaxine, fluoxetine and pilocarpine have not induced changes in the proliferation of acinar and ductal cells in rats parotids glands treated during 60 days.

Acknowledgements

Authors would like to thank the employees of the Laboratório de Patologia Experimental, Pontifícia Universidade Católica do Paraná. This study was supported by CNPq grant nº 474790/2004-5.

References

1. Moreno RA, Moreno D, Soares MBM. Psicofarmacologia dos antidepressivos. Rev Bras Psiquiatr [ISSN 1516-4446].2002 mai[2003 Jun 27]; 21(1): [24-40p.]. Available from: <http://www.scielo.br/cgi-bin/wxix.exe/iah/>
2. Sansone RA, Sansone LA. Pain, pain, go away: antidepressants and pain management. Psychiatry (Edgmont) 2008;5:16-9.
3. Cusack B, Nelson A, Richelson E. Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. Psychopharmacology (Berl) 1994;114:559-65.
4. Dhir A, Kulkarni SK. Antidepressant-like effect of 17 beta-estradiol: involvement of dopaminergic, serotonergic, and (or) sigma-1 receptor systems. Can J Physiol Pharmacol 2008;86:726-35.
5. Spina E, Santoro V, D'Arrigo C. Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update. Clin Ther 2008;30:1206-27.
6. Stahl SM. Psychopharmacology of antidepressants. London: Martin Dunitz;1997.p. 114.
7. Cipriani A, Brambilla P, Furukawa TA, Geddes J, Gregis M, Hotopf M, et al. Fluoxetine versus other types of pharmacotherapy for depression. Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library 2006;3.
8. Ferguson MM. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1993;75:186-91.

9. Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis* 2003;9:165-76.
10. Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 2003;134:61-9.
11. Keene JJ Jr, Galasko GT, Land MF. Antidepressant use in psychiatry and medicine: importance for dental practice. *J Am Dent Assoc* 2003;134:71-9.
12. Grégio AMT, Durscki JRC, Lima AAS, Machado MAN, Ignácio SA, Azevedo LR. Association of amitriptyline and diazepam on the histomorphometry of rat parotid glands. *Pharmacologyonline* 2006;2:96-108.
13. de Almeida P del V, Grégio AM, Brancher JA, Ignácio SA, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Effects of antidepressants and benzodiazepines on stimulated salivary flow rate and biochemistry composition of the saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:58-65.
14. ZacliKevis MV, D'Agulham AC, Bertassoni LE, Machado MA, de Lima AA, Grégio AM, Azevedo-Alanis, LR. Effects of benzodiazepine and pilocarpine on rat parotid glands: histomorphometric and sialometric study. *Med Chem* 2009;5:74-8.
15. da Silva S, de Azevedo LR, de Lima AA, Ignácio SA, Machado MA, ZacliKevis MV, Grégio AM. Effects of fluoxetine and venlafaxine and pilocarpine on rat parotid glands. *Med Chem* 2009;5:483-90.

16. Klein RM. Development, structure and function of the salivary glands. In: Avery JK. Oral development and histology. USA: New York; 2001.p.292-331.
17. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, embryology and histology. Chicago: Mosby; 2002 p.255-67.
18. Zarbo RJ, Prasad AR, Regezi JA, Gown AM, Saveria AT. Salivary gland basal cell and canalicular adenomas: immunohistochemical demonstration of myoepithelial cell participation and morphogenetic considerations. Arch Pathol Lab Med 2000;124:401-5.
19. Burford-Mason AP, Cummins MM, Brown DH, MacKay AJ, Dardick I. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. J Oral Pathol Med 1993;22:440-6.
20. Norberg L, Dardick I, Burford-Mason AP. Differentiating myoepithelial and acinar cells in rat neonatal parotid gland and histogenetic concepts for salivary gland tumors. J Oral Pathol Med 1996;25:474-80.
21. 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;23:568-75.
22. Takahashi S, Schoch S, Walker NI. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. Int J Exp Pathol 1998;79:293-301.
23. Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford–Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat

- parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:674-80.
24. Rocha RM, Andrade VP, Nunes CB, Rocha GFS, Sanches FSF, Oliveira FS et al. Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:477-82.
 25. Schuler S, Gurmini J, Cecílio WA, Viola de Azevedo ML, Olandoski M, de Noronha L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008;32:184-9.
 26. Martinez-Madrigal F, Micheau C. Histology of the major salivary glands. *Am J Surg Pathol* 1989;13:879-99.
 27. Gorenstein C, Scavone C. Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. *Rev Bras Psiquiatr* 1999;2:64-73.
 28. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Pharmacology*. London: Churchill Livingstone: 2007; p.557-74.
 29. Davies AN, Shorthose K. Parasympathomimetic drugs for the treatment of salivary gland dysfunction due to radiotherapy. *Cochrane Database Syst Ver* 2007;18:19.
 30. Grisius MM. Salivary gland dysfunction: a review of systemic therapies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:156-62.
 31. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc* 2002;50:535-43.
 32. Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Biol Med* 1997;8:51-75.

33. Miguel MC, Andrade ES, Taga R, Pinto LP, Souza LB. Hyperplasia of myoepithelial cells expressing calponin during atrophy of the rat parotid gland induced by duct ligation. *Histochem J* 2002;34:499-506.
34. Wynn RL, Meiller TF. Drugs and dry mouth. *Gen Dent* 2001;49:10-2,14.
35. Craig CR. Introduction to central nervous system pharmacology. In: Craig CR, Stitzel RE (editors). *Modern pharmacology with clinical applications*. 5th ed. Boston: Little Brown; 1997, p.293-302.
36. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. *Robbins pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1999;p.336.

Table 1 – Control and experimental groups according to drugs used.

Groups	N	Drugs	Period of treatment	Dose	Administration
1- C30	10	Saline	1-30 days	0.1 mL	Intraperitoneal
2- C60	10	Saline	1-60 days	0.1 mL	Intraperitoneal
3- PILO	10	Pilocarpine ¹	1-60 days	0.05 mL	Topic
4- F30	10	Fluoxetine ²	1-30 days	20 mg/kg	Intramuscular
5- V30	10	Venlafaxine ³	1-30 days	40 mg/kg	Intramuscular
6- FS60	10	Fluoxetine	1-30 days	20 mg/kg	Intramuscular
		Saline	31-60 days	0.1 mL	Intraperitoneal
7- VS60	10	Venlafaxine	1-30 days	40 mg/kg	Intramuscular
		Saline	31-60 days	0.1 mL	Intraperitoneal
8- FP60	10	Fluoxetine	1-30 days	20 mg/kg	Intramuscular
		Fluoxetine + Pilocarpine	31-60 days	20 mg/kg e 0.05 mL	Intramuscular e Topic
9- VP60	10	Venlafaxine	1-30 days	40 mg/kg	Intramuscular
		Venlafaxine + Pilocarpine	31-60 days	40 mg/kg e 0.05 mL	Intramuscular e Topic

N: Sample size

¹: Gel base prepared with 1% pilocarpine hidrocloridrate (Gerbras Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil)

²: Injectable Fluoxetine (20040625, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil)

³: Injectable Venlafaxine (D/VN/002/02, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, Brasil)

Table 2 – Mean values and standard deviations of the studied variables in groups treated during 30 days with saline (C30), fluoxetine (F30) e venlafaxine (V30).

Groups	C30		F30		V30		p value
	X	SD	X	SD	X	SD	
SSFR (mL/min) ^δ	0.051 ± 0.026 ^{a,b}		0.014 ± 0.006 ^a		0.026 ± 0.022 ^b		0.001*
CV (mm ³) ^δ	6965.683 ± 3792.951 ^{a,b}		10384.311 ± 4869.539 ^a		11945.927 ± 7891.179 ^b		0.000*
PCNA	55.8 ± 14.382 ^a		59.4 ± 16.900 ^b		89.5 ± 16.400 ^{a,b}		0.000*
C	13.9 ± 2.644 ^{a,b}		20 ± 4.216 ^a		19.8 ± 5.007 ^b		0.003*

^δ: Values obtained from the study by Da Silva et al (2009)¹⁵

SSFR (mL/min.): Stimulated salivary flow rate, milliliters per minute

CV (mm³): Cellular volume, cubic milimeters

PCNA: anti-proliferating cell nuclear antigen

C: anti - calponin

X: mean

SD: standard deviation

p: value p ANOVA

Groups followed by the same letter differed from one another

* Statistically significant difference among groups (p<0.05)

Table 3 – Mean values and standard deviations of the studied variables in groups treated during 30 days with pilocarpine (PILO), saline (C60), fluoxetine e saline (FS60), venlafaxine and saline (VS60), fluoxetine and pilocarpine (FP60) e venlafaxine and pilocarpine (VP60).

Grupos	C60		PILO		FS60		VS60		FP60		VP60		p value
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	
SSFR (mL/min) ^δ	0.052 ± 0.029		0.067 ± 0.028 ^{a,b}		0.036 ± 0.017		0.020 ± 0.004 ^{a,c}		0.034 ± 0.014 ^b		0.055 ± 0.026 ^c		0.000*
CV (mm ³) ^δ	6505.564±		5825.418 ±		6809.347 ±		7525.112 ±		7519.797 ±		10194.315 ±		0.000*
	3343.475 ^d		1968.070 ^{ab}		3189.246 ^e		3196.085 ^{a,c}		4272.808 ^f		4456.345 ^{b,c,d,e,f}		
PCNA	50 ± 17.531		46.8 ± 13.506		36.7 ± 16.687		52.5 ± 18.710		52 ± 17.153		43.6 ± 18.007		0.296 ^{ns}
C	13.6 ± 4.789 ^{c,f}		22.1 ± 7.385 ^a		24.2 ± 7.955 ^{b,c}		19.7 ± 4.322 ^d		7 ± 1.563 ^{a,b,d,e,f}		18.2 ± 6.250 ^e		0,000*

^δ: Values obtained from the study by Da Silva et al (2009)¹⁵

SSFR (mL/min.): Stimulated salivary flow rate, milliliters per minute

CV (mm³): Cellular volume, cubic millimeters

PCNA: anti-proliferating cell nuclear antigen

C: anti - calponin

X: mean

SD: standard deviation

p: value p ANOVA

Groups followed by the same letter differed from one another

* Statistically significant difference among groups (p<0.05)

^{ns} – No statistically significant difference among groups (p>0.05)

FIGURES

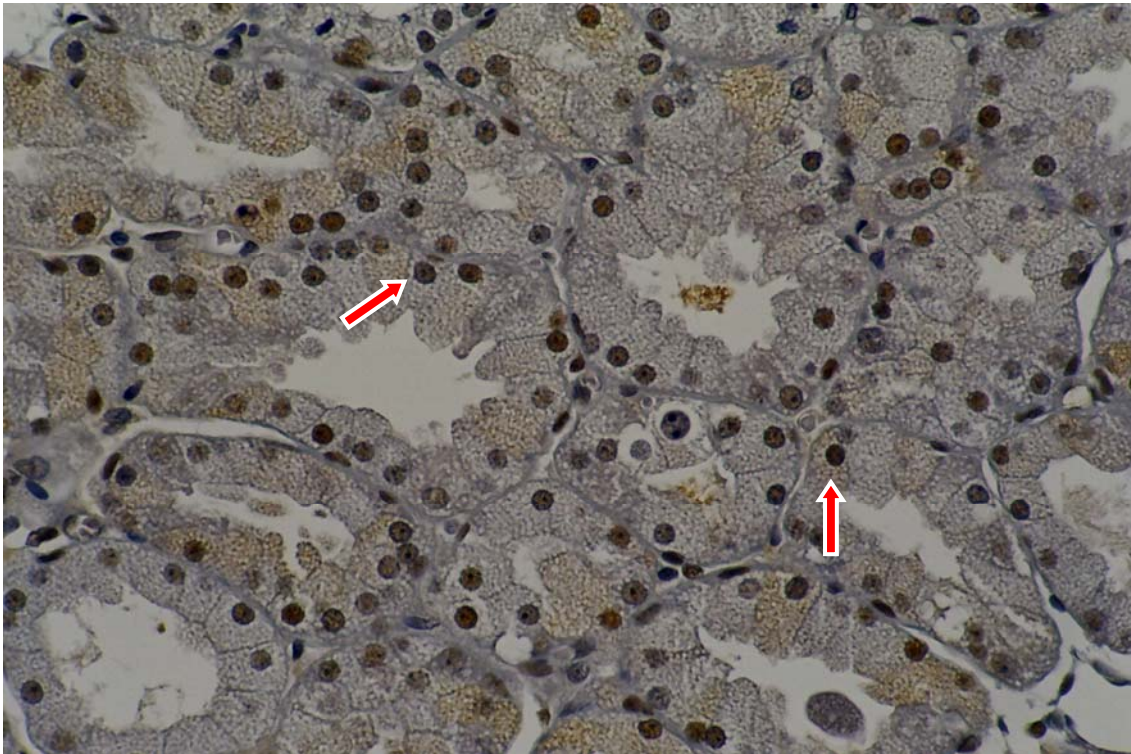


Figure 1

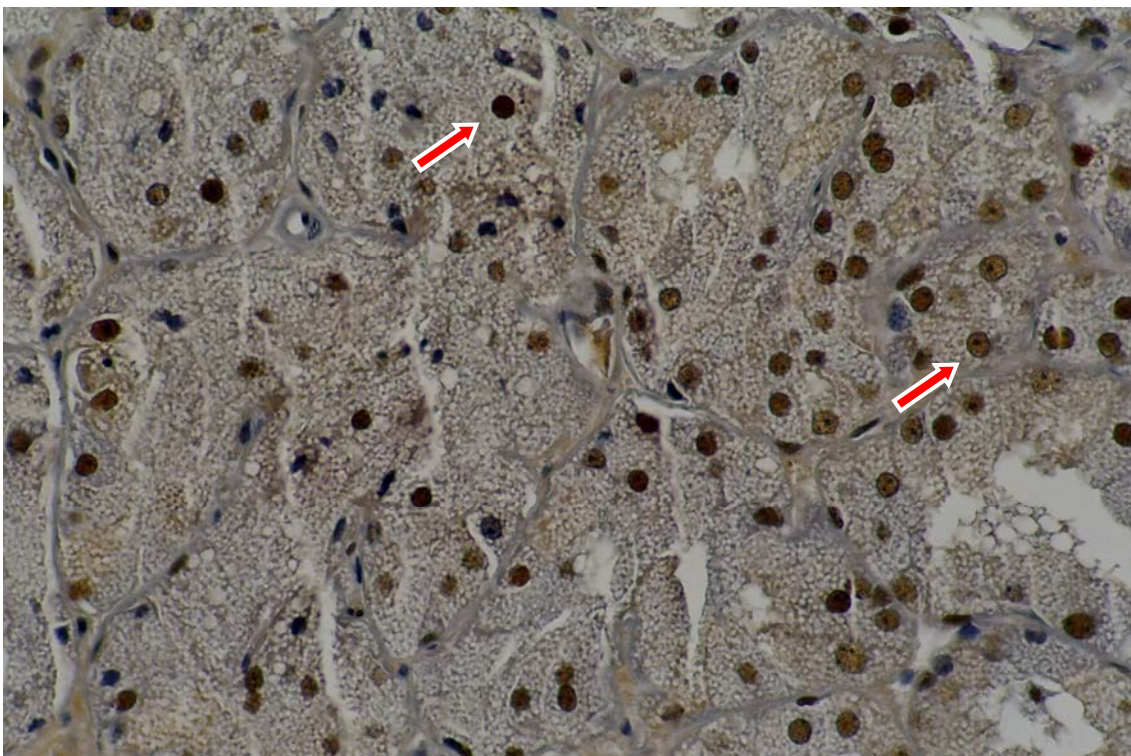


Figure 2

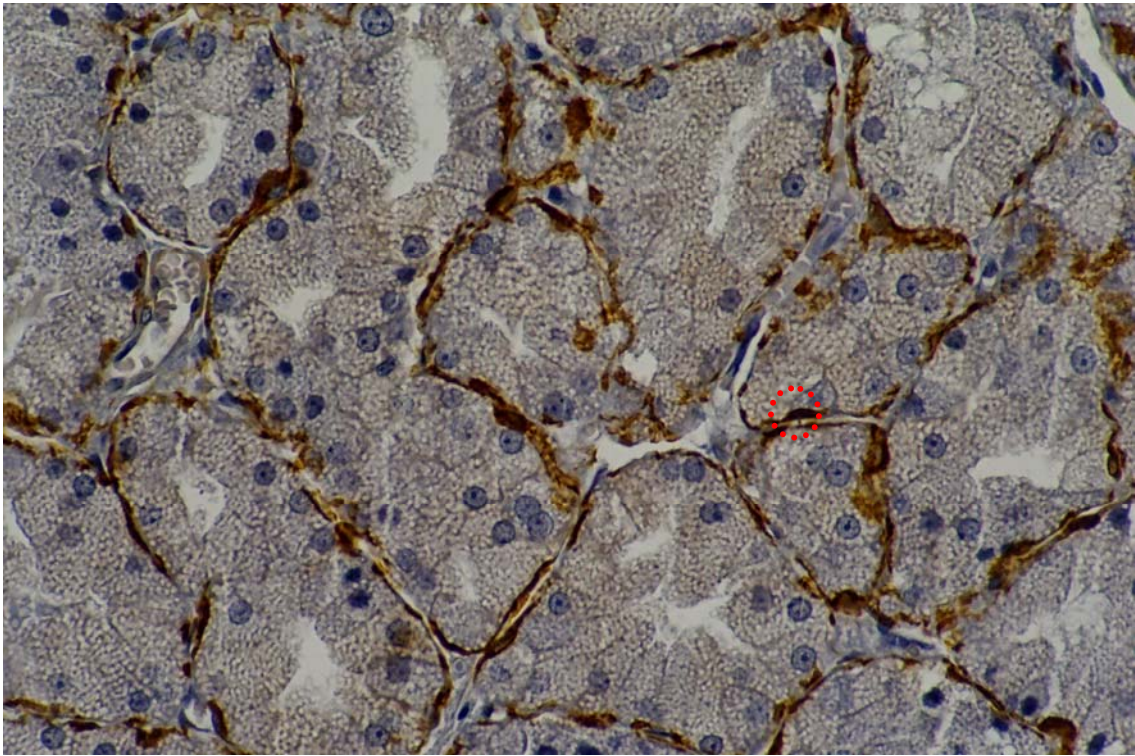


Figure 3

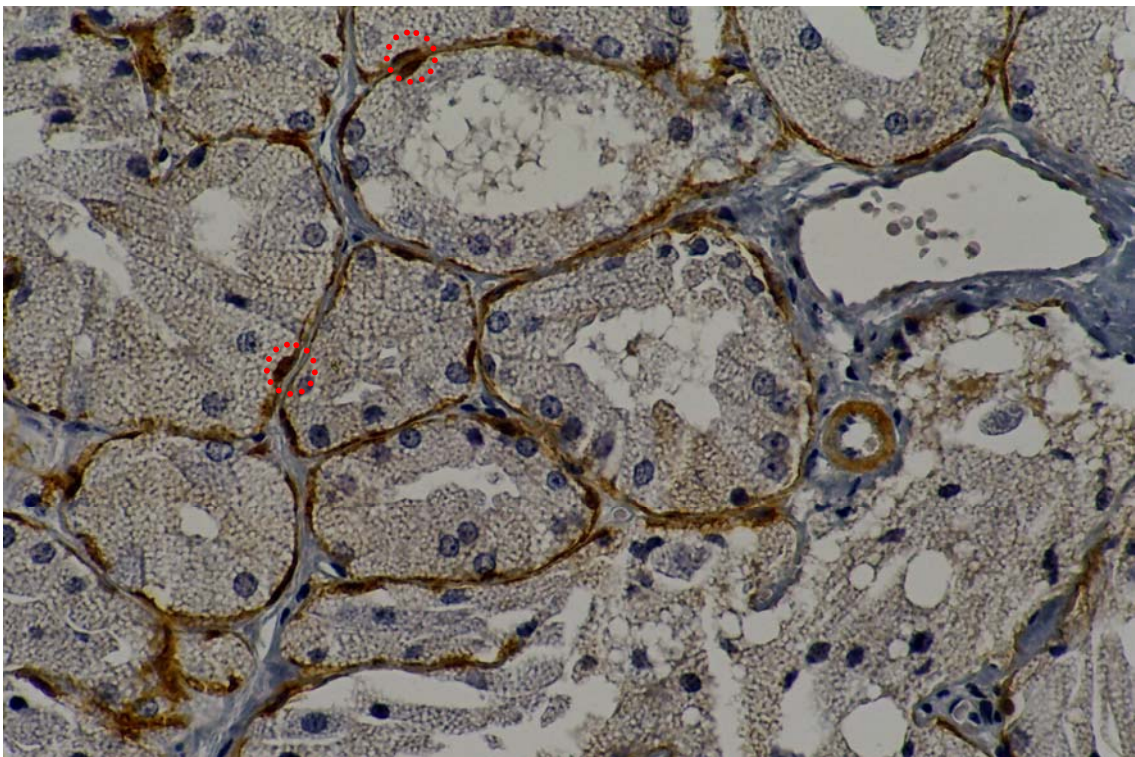


Figure 4

Legends to illustrations

Figure 1: Parenchyma of rat parotid gland showing positive-staining cells for anti-proliferating cell nuclear anti-antigen (PCNA). (Group FP60; original magnification 400 X)

Figure 2: Parenchyma of rat parotid gland showing disorganization and positive-staining cells for anti-proliferating cell nuclear anti-antigen (PCNA). (Group VP60; original magnification 400 X)

Figure 3: Normal parenchyma of rat parotid gland showing positive-staining cells for anti-calponin around the acini. (Group C30, original magnification 400 X)

Figure 4: Parenchyma of rat parotid gland showing positive-staining cells for anti-calponin, arranged on the periphery of the acini. (Group V30, original magnification 400 X)

4. Artigo 2. Efeitos de benzodiazepínicos e da pilocarpina sobre glândulas parótidas de ratos. Estudo imunoistoquímico.

Título: Efeitos de benzodiazepínicos e da pilocarpina sobre glândulas parótidas de ratos. Estudo imunoistoquímico.*

Tatiana Maria Folador Mattioli, DDS, MSc^a, Silvana da Silva, DDS, MSc^a, Ana Maria Trindade Grégio, PharmaB, PhD^b, Antônio Adilson Soares de Lima, DDS, PhD^b, Lúcia de Noronha, MD, PhD^b, Luciana Reis Azevedo-Alanis, DDS, PhD^c

^a Post-graduate student, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^b Titular professor, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

^c Adjunct professor, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Autor correspondente:

Luciana Reis Azevedo-Alanis

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Pós-graduação em Odontologia

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho 80215-901

Curitiba, Paraná, Brazil

Phone: +55 (41) 3271-2592

Fax: +55 (41) 3271-1405

l.azevedo@pucpr.br

* Artigo nas normas Vancouver, ainda sem definição do periódico a ser enviado.

Resumo

Objetivos: Avaliar o comportamento das células acinares, ductais e mioepiteliais de glândulas parótidas de ratos sob tratamento com benzodiazepínicos (BZDs) e pilocarpina.

Métodos: Noventa ratos machos Wistar foram distribuídos em nove grupos. Os grupos controle receberam solução salina durante 30 (C30) e 60 dias (C60) e pilocarpina (PILO) durante 60 dias. Os grupos experimentais receberam lorazepam (L30) e midazolam (D30), durante 30 dias; lorazepam (LS60) e midazolam (DS60) associados a salina durante 60 dias, e lorazepam (LP60) e midazolam (DP60) associados com pilocarpina durante 60 dias. A expressão imunistoquímica da calponina foi avaliada nas células mioepiteliais e do PCNA, nas células acinares e ductais. ANOVA, Tukey HSD e Games-Howell foram aplicados para detectar diferenças entre os grupos ($p < 0,05$).

Resultados: Os grupos tratados com lorazepam mostraram um aumento no número de células marcadas pela calponina comparados com controles ($p < 0,05$). Grupo tratado com midazolam e pilocarpina (MP60) induziu aumento na proliferação de células acinares e ductais e diminuição nas células marcadas pela calponina comparado ao grupo tratado com midazolam e salina (MS60).

Conclusão: As células mioepiteliais mostraram-se mais sensíveis aos efeitos dos BZDs do que as células acinares e ductais nas parótidas de ratos.

Palavras Chave: Benzodiazepínicos, Imunoistoquímica, Glândulas salivares parótidas

Abstract

Objectives: To evaluate the effects of benzodiazepines (BZDs) and pilocarpine on rat parotid glands and on the behavior of acinar, ductal and myoepithelial cells.

Methods: Ninety male Wistar rats were allocated to nine groups. Control groups received saline during 30 (C30) and 60 days (C60), and pilocarpine (PILO) during 60 days. Experimental groups received lorazepam (L30) and midazolam (D30) during 30 days; lorazepam (LS60) and midazolam (DS60) associated with saline during 60 days, and lorazepam (LP60) and midazolam (DP60) associated with pilocarpine during 60 days. The immunohistochemical expression of calponin on myoepithelial cells, and PCNA on acinar and ductal cells was evaluated. ANOVA, Tukey HSD and Games-Howell tests were applied to detect differences among the groups ($p < 0.05$).

Results: Groups treated with lorazepam showed an increase in the number of positive staining cells for calponin when compared with controls ($p < 0.05$). Midazolam associated with pilocarpine (MP60) induced an increase in the proliferation of acinar and ductal cells and a decrease in the positive staining cells for calponin compared with midazolam associated with saline (MS60).

Conclusion: Myoepithelial cells showed to be more sensible to the effects of benzodiazepines than acinar and ductal cells in rat parotid glands.

Key Words: Benzodiazepines, Immunohistochemistry, Parotid salivary glands

Introdução

Os benzodiazepínicos (BZDs) são um grupo de fármacos utilizados como ansiolíticos, hipnóticos, sedativos, relaxantes musculares e anticonvulsivantes. Substituíram largamente os barbitúricos, mas, ao contrário deles, não têm ação depressora do centro respiratório, sendo, por isso, de uso mais seguro, além de apresentarem maior especificidade sobre a sintomatologia ansiosa.¹ Os BZDs são responsáveis por cerca de 50% de toda a prescrição de psicotrópicos.²

Os BZDs agem sobre um sub-receptor específico, o receptor das benzodiazepinas, no receptor A do GABA (ácido gama-aminobutírico), que é um neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC). Os BZDs tornam os receptores GABA_A mais sensíveis à ativação pelo próprio GABA (agem num sub-receptor da proteína do receptor). O GABA é um neurotransmissor que abre canais de cloro, hiperpolarizando o neurônio e inibindo a geração de potencial de ação, ou seja, potencializa o efeito inibitório do GABA fisiológico no seu próprio receptor.³

Dentre os vários efeitos adversos dos BZDs, estão a hipossalivação e a xerostomia.⁴ A ação anticolinérgica das drogas ansiolíticas pode estar relacionada a sua afinidade pelos receptores adrenérgicos e colinérgicos presentes nas glândulas salivares e ainda à redução do influxo colinérgico e simpático do SNC.⁵

As células mioepiteliais localizam-se entre a lâmina basal e a membrana plasmática de células acinares secretoras e ductos intercalados.⁶ Caracterizam-se pelo rico conteúdo de miofilamentos de actina e miosina no seu citoplasma, o que torna a contratilidade uma de suas principais funções.⁷

São células altamente especializadas, que têm um fenótipo duplo, ou seja, epitelial e muscular liso,⁸ e contribuem para o esvaziamento das unidades secretoras e ductos.⁹ Caracterizam-se pela imunorreatividade pelo anticorpo contra o antígeno calponina, proteína envolvida no sistema de regulação da contração do músculo liso.¹⁰

O anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um anticorpo monoclonal que possibilita o estudo da cinética celular;¹¹ portanto é um marcador de proliferação celular capaz de identificar células acinares e ductais em proliferação.¹²

Grégio et al., em 2006,⁵ ao estudarem o efeito do tratamento crônico da associação de BZDs (Diazepam[®]) e antidepressivo (Tryptanol[®]) sobre glândulas parótidas de ratos, observaram hipossalivação e hipertrofia das células serosas, o que sugeriu uma possível inibição da atividade das células mioepiteliais, decorrente de estimulação nervosa, ou diminuição no número destas células frente ao uso crônico dos psicotrópicos, ou ainda, alteração no número de células acinares e ductais.⁵

O objetivo deste estudo foi analisar o comportamento das células mioepiteliais, acinares e ductais de glândulas parótidas de ratos tratados com midazolam e lorazepam, por meio de imunorreação com o anticorpo contra antígeno calponina e com o anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).

Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Tuiuti do Paraná (CEP-UTP n. 55/2003).

A amostra foi constituída por glândulas parótidas de ratos machos, tipo *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *mammalia* da linhagem *Wistar*, com peso aproximado de 250 g, incluídas em blocos de parafina e provenientes do acervo do laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Foram utilizados 90 animais, divididos em nove grupos, cada grupo constituído por 10 animais. Os animais receberam diferentes terapêuticas, conforme descrito na Tabela 1.¹⁴

Cada bloco de parafina continha 10 *tissues microarray* (TMA) de 3 mm de diâmetro^{20,21} de glândulas parótidas de ratos. Foram realizados cortes microscópicos com 4 µm de espessura e, em seguida, as lâminas obtidas foram submetidas aos testes imunistoquímicos.

Para a técnica da imunistoquímica foram utilizados os anticorpos anti-calponina e anti-PCNA. Ambos foram diluídos com diluente da Dako (DakoCytomation®; Dako North America, Carpinteria, CA, USA). O anticorpo secundário utilizado foi EnVision®+Dual Link/Peroxidase (DakoCytomation®) e para as revelações das ligações antígeno-anticorpo, utilizou-se o sistema substrato-cromógeno DAB (DakoCytomation®). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris.

Para a marcação das células mioepiteliais, foi utilizado o anticorpo monoclonal contra o antígeno calponina (C) (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). As imunorreações com a C utilizaram diluição do anticorpo em 1:800. Para a marcação das células acinares e ductais em proliferação, foi utilizado o anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA (Dako Corporation). O PCNA é um anticorpo monoclonal que possibilita o

estudo da cinética celular. As imunorreações com o PCNA utilizaram diluições do anticorpo em 1:400.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico Olympus® BX50 (Olympus Corporation, Ishikawa, Japão), utilizando objetiva de 40X, por um único examinador (T.M.F.M.). A expressão imunoistoquímica da C nas células mioepiteliais e do PCNA nas células acinares e ductais foi analisada verificando-se imagens de 24 campos histológicos, equivalentes a toda a área do TMA.

Todos os espécimes estudados exibiram positividade para o anticorpo C, sendo considerada positiva a célula que exibiu qualquer expressão para C no epitélio glandular, representada por cor acastanhada, independente da intensidade da marcação, ou seja, o suficiente para diferenciação entre as células positivas e negativas.

Foi avaliada a presença ou ausência de marcação para o anticorpo PCNA. Considerou-se positiva a célula que exibiu qualquer expressão para o PCNA no epitélio glandular, representada por cor acastanhada, independente da intensidade da marcação.

Considerou-se que em cada TMA havia 24 campos histológicos. Previamente à contagem do número de células marcadas pelos anticorpos, foram verificados quantos campos dentre os 24 eram possíveis de serem avaliados. Para isso, foi levada em consideração a integridade e a qualidade do tecido, e a presença de artefatos de técnica. Após a avaliação dos 24 campos histológicos de todos os TMA, foram obtidos os índices numéricos das células marcadas positivamente para C e para o PCNA.

Para determinar o valor médio do número de células marcadas pela C e pelo PCNA de cada TMA, foi realizado o seguinte cálculo: o valor médio de células marcadas no TMA foi igual à soma do número de células marcadas em cada campo avaliado, dividido pelo número de campos avaliados. Após a obtenção do valor médio de cada TMA, os mesmos foram somados e divididos por 10 (equivalente ao número total de TMA) e, assim, foi obtido o valor médio de células marcadas de cada grupo.

Além das variáveis C e PCNA, foram utilizados neste trabalho, os valores médios das variáveis fluxo salivar estimulado (FSE) e volume celular (VC), obtidos do trabalho de Da Silva et al., 2009¹³ (Tabelas 2 e 3). Uma vez que ambos os trabalhos estudaram a mesma amostra, foram comparados os achados do FSE e do VC com os resultados da marcação imunoistoquímica pela C e PCNA.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados por meio do software SPSS versão 15.0 para Windows. A normalidade das variáveis e a homogeneidade de variâncias foram analisadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente.

Para os grupos que apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Anova a 01 critério. Quando Anova a 01 critério 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.

Todos os testes estatísticos foram realizados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Dos nove grupos avaliados, três (C30, M30, L30) receberam tratamento durante 30 dias, enquanto os outros seis grupos (C60, PILO, MS60, LS60, MP60, LP60) foram tratados por 60 dias. As variáveis analisadas foram C e PCNA, as quais foram comparadas às variáveis VC e FSE.¹³

Grupos tratados por 30 dias

A Tabela 2 mostra os valores médios, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas segundo os grupos tratados por 30 dias (C30, M30 e L30). Houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados por 30 dias para as variáveis FSE, VC e C ($p < 0,05$).

Para FSE, houve diferença significativa entre os grupos C30 e L30 ($p = 0,002$), e C30 e M30 ($p = 0,001$). O grupo C30 apresentou o maior valor médio de FSE.

Para VC, houve diferença significativa entre C30 e M30 ($p = 0,000$), C30 e L30 ($p = 0,000$), e M30 e L30 ($p = 0,002$). O grupo M30 apresentou o maior valor médio de VC, seguido pelos grupos L30 e C30.

Para C, houve diferença significativa entre os grupos C30 e L30 ($p = 0,001$), sendo o maior valor médio de C no último.

Grupos tratados por 60 dias

A Tabela 3 mostra os valores das médias, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas de acordo com os grupos tratados por 60 dias (C60, PILO, MS60, LS60, MP60 e LP60).

Houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos tratados por 60 dias para as variáveis FSE, VC, PCNA e C ($p < 0,05$).

Para FSE, o maior valor médio foi no grupo PILO e o menor valor no grupo MS60. Houve diferenças significantes entre os grupos LS60 e LP60, PILO e LS60, PILO e MS60 ($p < 0,05$).

Os maiores valores de VC foram nos grupos LS60 e MP60, com diferença significante quando comparados ao grupo C60 ($p < 0,05$).

Para C, os maiores valores médios foram nos grupos LS60 e LP60 e o menor valor no grupo C60. Houve diferenças significantes entre C60 e LS60, C60 e LP60, C60 e PILO ($p < 0,05$).

O maior valor médio de PCNA foi no grupo MP60 com diferença significante quando comparado aos grupos LS60 e MS60 ($p < 0,05$).

As Figuras 1-4 ilustram fotomicrografias de glândulas parótidas de ratos de grupos controles e experimentais.

Discussão

O uso crônico de lorazepam e midazolam por 30 dias provocou redução do FSE e aumento do VC em glândulas parótidas de ratos. O lorazepam, quando administrado durante 30 dias (grupo L30), foi responsável pelo aumento do número de células mioepiteliais comparado a salina (grupo C30). Quando administrada em associação com o lorazepam durante 60 dias, a pilocarpina foi capaz de restabelecer o FSE normal de ratos (grupos C60, LS60 e LP60). O uso do lorazepam associado a salina (LS60) ou a pilocarpina (LP60) provocou aumento do número de células mioepiteliais comparado ao grupo que recebeu salina (C60). Quando a pilocarpina foi associada ao midazolam (MP60), houve aumento da proliferação de células acinares e

ductais e diminuição do número de células mioepiteliais quando comparado ao grupo que recebeu midazolam e salina (MS60).

O tratamento crônico com lorazepam e midazolam durante 30 e 60 dias provocou redução do FSE em ratos. Nos grupos tratados por 30 dias, a redução do FSE foi mais severa que nos grupos tratados por 60 dias. Vale lembrar que, nos grupos tratados por 60 dias (MS60 e LS60), houve suspensão dos medicamentos e administração de salina nos 30 últimos dias. É possível que esta manobra tenha permitido que houvesse uma reorganização dos mecanismos de secreção salivar nas glândulas parótidas. Para compreender melhor esses resultados, alguns tópicos devem ser discutidos, dentre eles: a farmacocinética e a farmacodinâmica dos BZDs, a presença de receptores periféricos em glândulas salivares, a adaptação fisiológica frente ao uso de psicotrópicos, a alteração de sensibilidade dos receptores no uso crônico dos psicofármacos e a atividade das células mioepiteliais, acinares e ductais.

Os BZDs atuam seletivamente nos receptores $GABA_A$ que medeiam a transmissão sináptica em todo o SNC. Os BZDs intensificam a resposta ao GABA facilitando a abertura de canais cloreto ativados pelo GABA.¹⁶ A ativação dos receptores $GABA_A$ aumenta a condutância ao íon cloro, que se encontra em maior concentração na superfície externa da membrana. Como o fluxo de cloro obedece o gradiente de concentração, ocorre hiperpolarização da membrana pós-sináptica que inibe os disparos do neurônio pós-sináptico por dificultar a despolarização de sua membrana, necessária à geração de impulso nervoso.¹⁶ Desta forma, há intensificação da atividade inibitória do SNC com a administração de BZDs.

Existem receptores GABA centrais e periféricos (localizados nas glândulas salivares).^{17,18} Kawaguchi & Yamagishi¹⁹ e Kosuge et al.²⁰ comprovaram a presença de receptores GABA periféricos em células acinares de glândulas parótidas e submandibulares de ratos. A quantidade de receptores nas glândulas salivares é menor do que no SNC.²¹

Numerosos estudos, tanto em seres humanos como em animais, têm demonstrado que os BZDs ocasionam diminuição da secreção salivar com graves efeitos colaterais bucais.^{4,22,23} Os BZDs atuam provocando a diminuição da secreção salivar por meio de receptores para BZDs presentes nas glândulas salivares e também por ações indiretas do SNC sobre as glândulas salivares por meio de receptores centrais para BZDs.^{24,25} Além de inibirem os receptores muscarínicos presentes nas glândulas salivares, que são responsáveis pela secreção salivar, os BZDs também modificam o transporte de cloro e o influxo do cálcio, os quais desencadeiam os processos de secreção do fluido. Como consequência, há diminuição da atividade da secreção salivar.^{19,26} Os BZDs também podem inibir os receptores β -adrenérgicos, suprimindo a liberação de amilase das glândulas parótidas de rato.²⁴

O presente estudo comprovou o efeito anticolinérgico do midazolam e do lorazepam, quando administrados de forma crônica durante 30 dias. Quando o tratamento estendeu-se por 60 dias, a redução do FSE não foi estatisticamente significativa comparada ao controle. Sabe-se que a utilização prolongada de drogas psicotrópicas é responsável por alteração na sensibilidade de receptores.³ Os efeitos terapêuticos e colaterais de uma droga diminuem gradualmente quando administrada de modo contínuo ou repetidamente, podendo ocasionar dessensibilização, resistência ou tolerância à droga. A

adaptação fisiológica também pode ocorrer, assim é comum observar que tanto os efeitos terapêuticos quanto os efeitos colaterais de fármacos tendem a diminuir com o tempo de administração, apesar do uso contínuo da droga.³ Assim, sugere-se que a redução mais branda do FSE em ratos tratados durante 60 dias ocorreu graças aos efeitos de tolerância ou de adaptabilidade dos psicotrópicos.

A ausência de diferença estatística significativa no FSE entre os grupos C60, MS60 e LS60 sugere que houve um restabelecimento do FSE normal dos ratos 30 dias após a suspensão da medicação (Tabela 3). No entanto, estes dados devem ser analisados com cautela uma vez que a redução de FSE de mais de 50% traz conseqüências clínicas deletérias relevantes (C60 – 0,052 mL/min; MS60 – 0,022 mL/min).

Um dos principais efeitos dos ansiolíticos e hipnóticos é a ação miorelaxante.¹⁶ As células mioepiteliais, apesar de serem classificadas como células não musculares, apresentam acentuada capacidade de contração.⁶ O citoplasma contém numerosos microfilamentos contráteis de actina e miosina, filamentos intermediários da família da citoqueratina 14 e estruturas típicas de fibras musculares lisas.²⁷ As células mioepiteliais exercem funções contráteis, contribuindo para o esvaziamento da secreção das unidades secretoras e dos ductos.^{6,27} Assim, sugere-se que a atividade miorelaxante ocasionada pelos ansiolíticos pode ser, em parte, responsável pela redução do FSE de ratos tratados com lorazepam e midazolam.

O uso crônico do lorazepam durante 30 (L30) e 60 dias (LS60 e LP60) provocou um aumento significativo do número de células mioepiteliais quando comparado a salina (C30 e C60). Para o midazolam (M30, MS60 e MP60), esta

diferença não ocorreu (Tabelas 2 e 3). Há importantes diferenças qualitativas e quantitativas na farmacocinética entre o midazolam e o lorazepam que necessitam ser discutidas. O lorazepam (exemplos de nomes comerciais: Lorax[®], Mesmerin[®]) é uma droga que não apresenta metabólitos ativos. Ele é metabolizado por meio de conjugação direta com um radical glicosídeo, um processo mais rápido que a oxidação. Além disso, o lorazepam tem meia vida curta (12-18 horas).¹⁶ Por outro lado, o midazolam (exemplos de nomes comerciais: Dormonid[®], Dormire[®]) possui metabólito ativo (derivado hidroxilado), cuja meia vida é 2 horas.¹⁶ A meia vida do midazolam é ultracurta (menor de 6 horas). Uma vez que o lorazepam tem meia vida até três vezes mais longa que o midazolam, seus efeitos atuam por mais tempo, o que poderia explicar alterações significativas nas glândulas salivares. Os BZDs, sendo fármacos lipossolúveis, têm liberação via secreção salivar, e podem circular por tempo prolongado na saliva.¹⁶

As células mioepiteliais têm função contrátil e estão envolvidas no auxílio da secreção da saliva, localizando-se ao redor dos ácinos e porção intercalar dos ductos.⁶ Vale especular que numa atividade compensatória do déficit de saliva, o organismo, na tentativa de aumentar a atividade das células mioepiteliais para expulsar a saliva retida, induz um aumento do número destas células, para que elas, em sua função de contratilidade, auxiliem a liberação da saliva retida. Burgess et al., em 1996,²⁸ comprovaram, por meio de estudos imunoistoquímicos em glândulas parótidas atroficas de ratos induzidas pela obstrução ductal, que as células mioepiteliais são capazes de proliferar, principalmente quando induzidas por uma injúria à glândula. Sugere-se que o

lorazepam possa atuar como agente agressor químico capaz de desencadear mitoses e, conseqüentemente, aumentar o número de células mioepiteliais.

No presente estudo, a pilocarpina associada com o lorazepam durante 60 dias foi capaz de restabelecer o FSE normal de ratos (grupos C60, LS60 e LP60), comprovando sua capacidade agonista colinérgica. Por apresentar ação colinomimética, a pilocarpina ativa os receptores muscarínicos M3 presentes nas glândulas salivares, promovendo um aumento da liberação de secreção salivar. Ainda não estão claras as vias de como estes mecanismos ocorrem. Kujirai, Sawaki, Kawaguchi²⁵ constataram que o diazepam (benzodiazepínico) foi capaz de induzir a redução do FSE pela pilocarpina em rato *in vivo* e que, nas células acinares das glândulas parótidas dos ratos, o diazepam provocou aceleração do influxo de cloro (Cl⁻) e inibição do efluxo.

Quando a pilocarpina foi associada ao midazolam, houve aumento da proliferação de células acinares e ductais e diminuição do número de células mioepiteliais quando comparado ao grupo que recebeu midazolam e salina. Isto pode ter sido conseqüência de um sinergismo farmacológico ou de uma interação farmacodinâmica entre midazolam e pilocarpina. É sabido que a associação de duas drogas pode resultar em sinergismo farmacológico, em que o efeito combinado das duas substâncias mostra-se maior que a soma de cada um isoladamente.²⁹ Por outro lado, as interações farmacodinâmicas resultam da ação dos fármacos envolvidos no mesmo receptor. Um fármaco pode aumentar o efeito do agonista por estimular a receptividade de seu receptor celular ou inibir enzimas que o inativam no local de ação. A diminuição de efeito pode dever-se à competição pelo mesmo receptor, tendo o antagonista maior afinidade.²⁹

Ensaio s laboratoriais são limitados pelas características neurofisiológicas eminentes e subjetivas dos animais. Apesar das limitações inerentes ao presente estudo, é possível transpor para a prática clínica, pelo menos parcialmente, resultados na elucidação de respostas nos organismos *in vivo*.

Conclusão

A utilização crônica do lorazepam mostrou-se capaz de induzir aumento do número de células mioepiteliais em glândulas parótidas de ratos. O midazolam associado a pilocarpina provocou aumento da proliferação de células acinares e ductais. As células mioepiteliais mostraram-se mais sensíveis a ação dos BZDs do que as células acinares e ductais de glândulas parótidas de ratos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio do Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Este trabalho teve auxílio financeiro do CNPq (processo 474790/2004-5).

Referências

1. Mental Health Foundation (MHF). Guidelines for the prevention and treatment of benzodiazepine dependence. Washington: MHF; 1992.
2. Hallfors DD, Saxe L. The dependence potential of short half-life benzodiazepines: a meta-analysis. *Am J Public Health* 1993;83:1300-4.
3. Gorenstein C, Scavone C. Avanços em psicofarmacologia - mecanismos de ação de psicofármacos hoje. *Rev Bras Psiquiatr* 1999;2:64-73.
4. Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia: etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 2003;134:61-9.
5. Grégio AMT, Durscki JRC, Lima AAS, Machado MAN, Ignácio SA, Azevedo LR. Association of amitriptyline and diazepam on the histomorphometry of rat parotid glands. *Pharmacologyonline* 2006;2:96-108.
6. Klein RM. Development, structure and function of the salivary glands. In: Avery JK. *Oral development and histology*. USA: New York; 2001.p.292-331.
7. Takahashi S, Schoch S, Walker NI. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. *Int J Exp Pathol* 1998;79:293-301.
8. Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Tajima Y, Matsuzaki O, Konno A, Kondo Y, Nagao K. Salivary gland malignant myoepithelioma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases. *Cancer* 1998;83:1292-9.
9. Norberg L, Dardick I, Burford-Mason AP. Differentiating myoepithelial and acinar cells in rat neonatal parotid gland and histogenetic concepts for salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 1996;25:474-80.

10. Norberg L, Dardick I, Leung R, Burford – Mason AP, Rippstein P. Immunogold localization of actin and cytokeratin filaments in myoepithelium of human parotid salivary gland. *Ultrastruct Pathol* 1992;16:555-68.
11. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992;71:505-14.
12. Burford-Mason AP, Cummins MM, Brown DH, MacKay AJ, Dardick I. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. *J Oral Pathol Med* 1993;22:440-6.
13. da Silva S, de Azevedo LR, de Lima AA, Ignácio SA, Machado MA, ZacliKevis MV, Grégio AM. Effects of fluoxetine and venlafaxine and pilocarpine on rat parotid glands. *Med Chem* 2009;5:483-90.
14. Rocha RM, Andrade VP, Nunes CB, Rocha GFS, Sanches FSF, Oliveira FS, Gobbi H. Construção de arrays de tecido com equipamento alternativo e de baixo custo para estudo imuno-histoquímico de tumores mamários. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42:477-82.
15. Schuler S, Gurmini J, Cecílio WA, Viola de Azevedo ML, Olandoski M, de Noronha L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2008;32:184-9.
16. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. *Pharmacology*. London: Churchill Livingstone: 2007; p.557-574.

17. Yamagishi H, Kawaguchi M. Characterization of central- and peripheral-type benzodiazepine receptors in rat salivary glands. *Biochem Pharmacol* 1998;55:209-14.
18. Yamagishi H, Watanabe M, Yazaki K, Sawaki, Kawaguchi M. Pharmacological characterization of an 18-kDa protein associated with the peripheral-type benzodiazepine receptor in salivary glands. *Jpn J Pharmacol* 2000; 82:110-5.
19. Kawaguchi M, Yamagishi H. Coupling of benzodiazepine and GABA(A) receptors in the salivary glands is a factor of drug-induced xerostomia. *Int Acad Biomed Drug Res* 1996;11:291-6.
20. Kosuge Y, Kawaguchi M, Sawaki K, Okubo M, Shinomiya T, Sakai T. Immunohistochemical study on GABAergic system in salivary glands. *Eur J Pharmacol* 2009;610:18-22.
21. Sawaki K, Ouchi K, Sato T, Kawaguchi M. Existence of gamma-aminobutyric acid and its biosynthetic and metabolic enzymes in rat salivary glands. *Jpn J Pharmacol* 1995;67:359-63.
22. Sreebny LM, Schwartz SS. A reference guide to drugs and dry mouth – 2nd edition. *Gerodontol* 1997; 14: 33-47.
23. Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombôs F, Rullo R, Festa V, Cirillo N. Oral manifestations of adverse drug reactions: guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22:681-91.
24. Okubo M, Kawaguchi M. Inhibitory regulation of amylase release in rat parotid acinar cells by benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 1998;359:243-9.

25. Kujirai M, Sawaki K, Kawaguchi M. Inhibitory effect of diazepam on muscarinic receptor–stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat parotid acinar cells. *Br J Pharmacol* 2002;137:945-52.
26. Kawaguchi M, Ouchi K, Ohse S, Baba Y. In vivo and in vitro studies on receptive mechanisms for benzodiazepines in rat parotid gland. *Dent Jpn (Tokyo)*1995;32:38-40.
27. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Oral anatomy, embryology and histology. Chicago: Mosby; 2002 p.255-67.
28. Burgess KL, Dardick I, Cummins MM, Burford–Mason AP, Bassett R, Brown DH. Myoepithelial cells actively proliferate during atrophy of rat parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:674-80.
29. Craig CR. Introduction to central nervous system pharmacology. In: Craig CR, Stitzel RE (editors). *Modern pharmacology with clinical applications*. 5th ed. Boston: Little Brown; 1997, p.293-302.

TABELA 1 - Divisão dos grupos controles e experimentais de acordo com a medicação, período de tratamento, dose diária e via de administração.

Grupos	n	Fármacos	Período de tratamento	Dose	Via de Administração
1- C30	10	Salina	1-30 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
2- C60	10	Salina	1-60 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
3- PILO	10	Pilocarpina ¹	1-60 dias	0,05 mL	Tópica
4- L30	10	Lorazepam ²	1-30 dias	0,5 mg/kg	Intramuscular
5- M30	10	Midazolam ³	1-30 dias	0,1 mg/kg	Intramuscular
6- LS60	10	Lorazepam	1-30 dias	0,5 mg/kg	Intramuscular
		Salina	31-60 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
7- MS60	10	Midazolam	1-30 dias	0,1 mg/kg	Intramuscular
		Salina	31-60 dias	0,1 mL	Intraperitoneal
8- LP60	10	Lorazepam	1-30 dias	0,5 mg/kg	Intramuscular
		Lorazepam + Pilocarpina	31-60 dias	0,05 mL	Intramuscular e Tópica
9- MP60	10	Midazolam	1-30 dias	0,1 mg/kg	Intramuscular
		Midazolam + Pilocarpina	31-60 dias	0,05 mL	Intramuscular e Tópica

N: tamanho da amostra

¹: Gel em ora base preparado com 1% de hidrocloreto de pilocarpina (Gerbras Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, Brasil)

²: Lorazepam (Cosmética Farmácia de Manipulação Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil)

³: Midazolam (Cosmética Farmácia de Manipulação Ltda, Curitiba, Paraná, Brasil)

Tabela 2 – Valores médios, desvio padrão e valor p das variáveis estudadas segundo os grupos tratados por 30 dias com salina (C30), midazolam (M30) e lorazepam (L30).

Grupos	C30		M30		L30		Valor p
	X	DP	X	DP	X	DP	
FSE (mL/min) ^δ	0,051 ± 0,025 ^{ab}		0,019 ± 0,009 ^b		0,019 ± 0,015 ^a		0,000*
VC (mm ³) ^δ	6.965,68 ±		20.036,56 ±		14.266,57 ±		0,000*
	3.792,96 ^{bc}		7.955,70 ^{ac}		8.790,42 ^{ab}		
C	13,9 ± 2,643 ^a		15,3 ± 7,118		21,9 ± 4,483 ^a		0,003*
PCNA	55,8 ± 14,382		39,6 ± 30,008		43,9 ± 22,467		0,286 ^{ns}

^δ: Valores obtidos do trabalho de Da Silva et al (2009)¹³

FSE (mL/min): Fluxo salivar estimulado em mililitros por minuto

VC: Volume celular em milímetros cúbicos

PCNA: Anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular

C: Anticorpo contra antígeno calponina

X: média

DP: desvio padrão

p: valor p de ANOVA

Letras iguais representam diferença estatística significativa entre grupos.

*: diferença estatística (p<0,05)

^{ns} não significativa

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das variáveis estudadas segundo os grupos tratados com pilocarpina (PILO), salina (C60), lorazepam e salina (LS60), midazolam e salina (MS60), lorazepam e pilocarpina (LP60) e midazolam e pilocarpina (MP60).

Grupos	PILO		C60		LS60		MS60		LP60		MP60		Valor p
	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	X	DP	
FSE (mL/min) ^δ	0,066 ± 0,027 ^{ab}		0,052 ± 0,028		0,025 ± 0,004 ^{ac}		0,022 ± 0,005 ^{bd}		0,040 ± 0,008 ^{cd}		0,038 ± 0,028		0,000*
VC (mm ³) ^δ	5.825,42 ±		6.505,56 ±		9.382,75 ±		8.143,93 ±		7.481,02 ±		9.152,06 ±		0,000*
	1.968,07 ^{abc}		3.343,48 ^{de}		2.769,85 ^{ad}		3.470,78 ^b		4.468,91		4.605,78 ^{ce}		
C	21,1 ± 7,385 ^a		13,6 ± 4,788 ^{adg}		25 ± 6,182 ^{b^{dh}}		15,6 ± 6,221 ^{bce}		25,1 ± 5,526 ^{efg}		14,3 ± 6,147 ^{cfh}		0,000*
PCNA	46,8 ± 13,505		50 ± 17,530		41,5 ± 18,069 ^a		39 ± 14,110 ^b		46,8 ± 15,746		67 ± 19,102 ^{ab}		0,006*

δ: Valores obtidos do trabalho de Da Silva et al (2009)¹³

FSE (mL/min.): Fluxo salivar estimulado em mililitros por minuto

VC: Volume celular em milímetros cúbicos

PCNA: Anticorpo anti-antígeno nuclear de proliferação celular

C: Anticorpo contra antígeno calponina

X: média

DP: desvio padrão

p: valor p de ANOVA

Letras iguais representam diferença estatística significativa entre grupos

*: diferença estatística (p<0,05)

FIGURAS

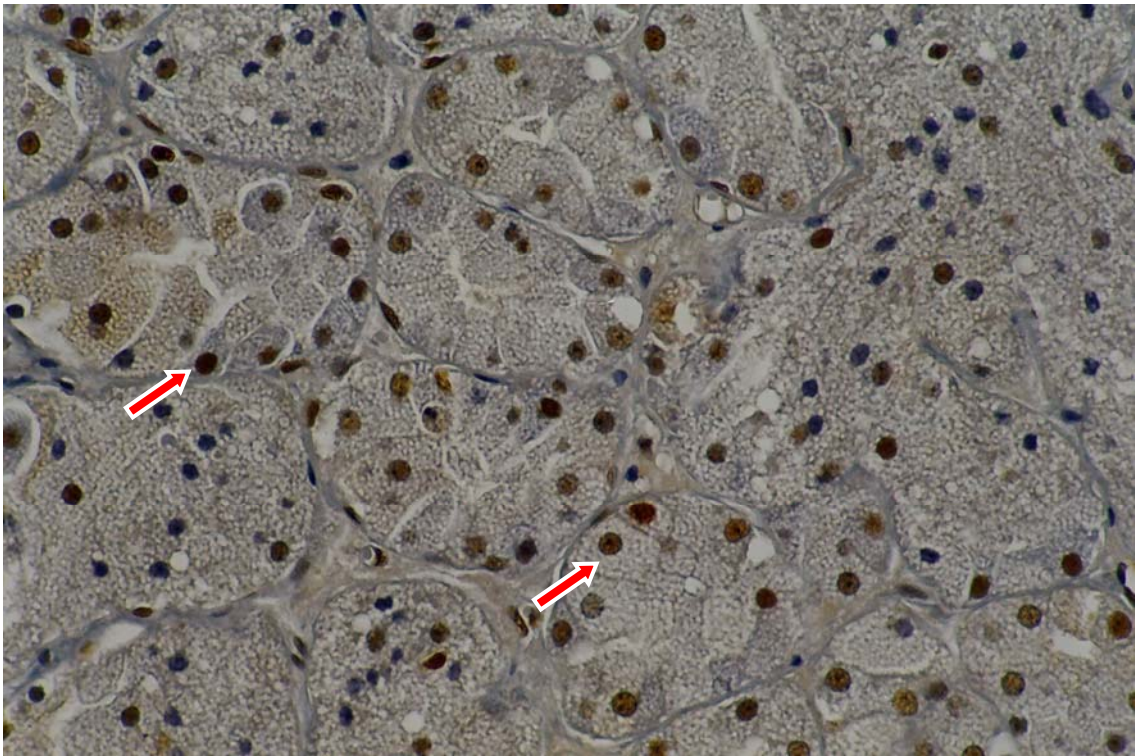


Figura 1

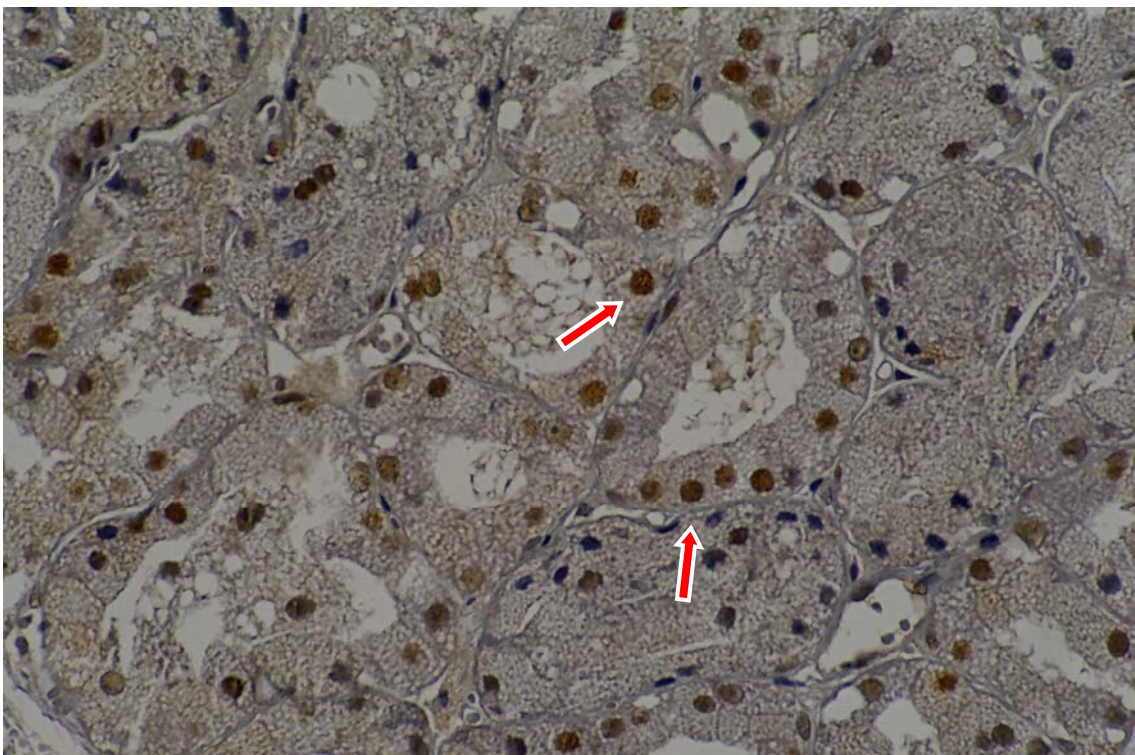


Figura 2

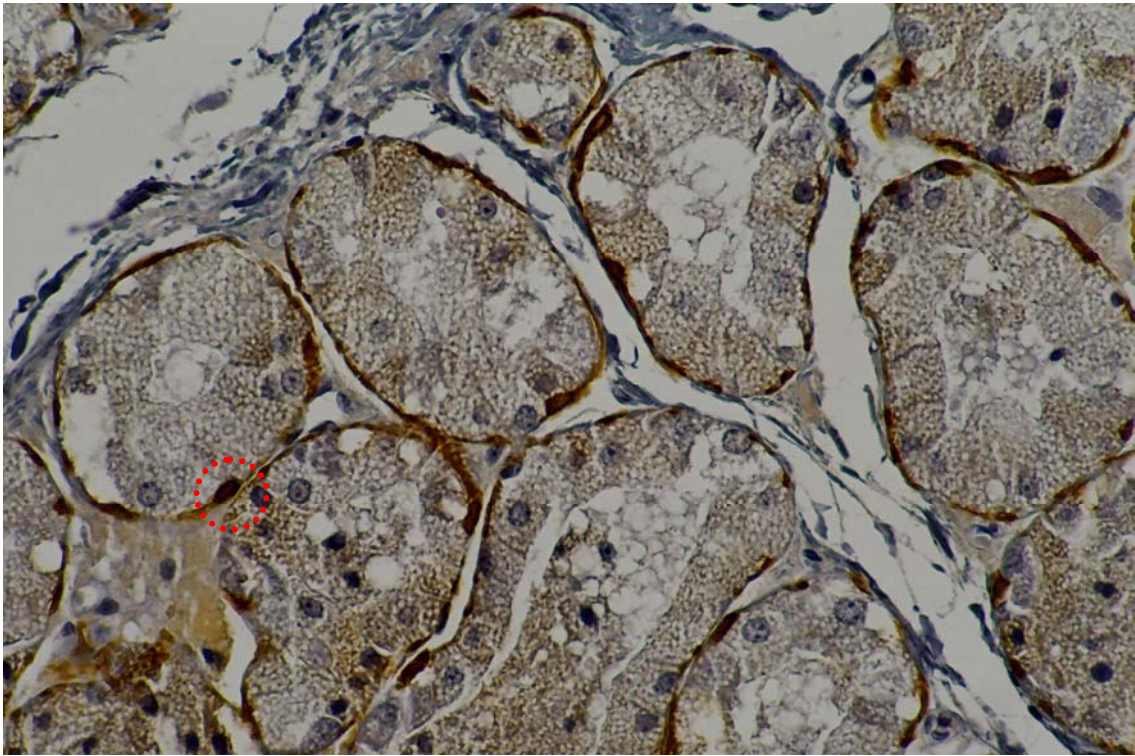


Figura 3

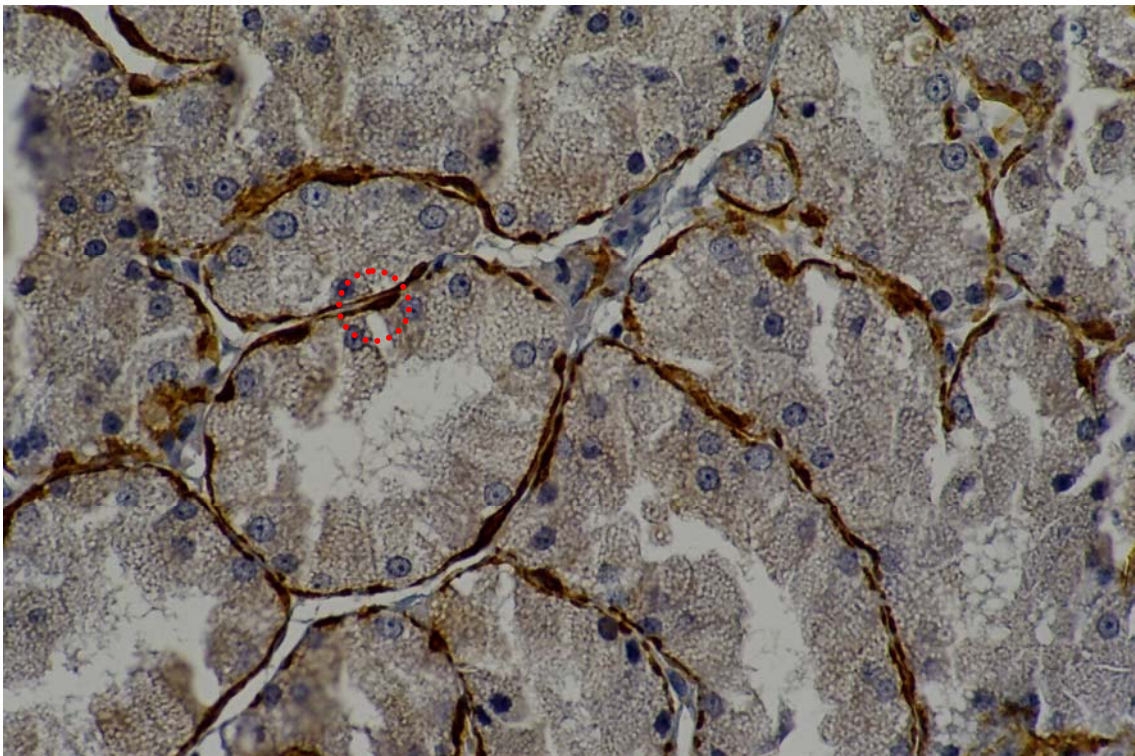


Figura 4

Legendas das figuras

Figura 1: Parênquima normal de glândula parótida de rato exibindo núcleos de células acinares em proliferação celular marcados pelo anti-PCNA. (Grupo C60; aumento original 400 X)

Figura 2: Parênquima de glândula parótida de rato mostrando núcleos de células acinares em proliferação celular marcados pelo anti-PCNA. (Grupo MS60; aumento original 400 X)

Figura 3: Parênquima de glândula parótida de rato exibindo células mioepiteliais marcadas com anti-calponina (Grupo PILO, aumento original 400 X)

Figura 4: Parênquima de glândula parótida de rato mostrando células mioepiteliais marcadas com anti-calponina na periferia de ácinos (Grupo M30, aumento original 400 X)

5. Referências

1. Scully C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. *Oral Dis* 2003;9:165-76.
2. Wynn RL, Meiller TF. Drugs and dry mouth. *Gen Dent* 2001;49:10-2,14.
3. Okubo M, Kawaguchi M. Inhibitory regulation of amylase release in rat parotid acinar cells by benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol* 1998 23;359:243-9.
4. Kawaguchi M, Ouchi K, Ohse S, Baba Y. In vivo and in vitro studies on receptive mechanisms for benzodiazepines in rat parotid gland. *Dent Jpn (Tokyo)*1995;32:38-40.
5. Kawaguchi M, Yamagishi H. Coupling of benzodiazepine and GABA(A) receptors in the salivary glands is a factor of drug-induced xerostomia. *Int Acad Biomed Drug Res* 1996;11:291-6.
6. Sreebny LM, Schwartz SS. A reference guide to drugs and dry mouth – 2nd edition. *Gerodontol* 1997; 14: 33-47.
7. Rafaelsen OJ, Clemmesen L, Lund H, Mikkelsen PL, Bolwing TG. Comparison of peripheral anticholinergic effects of antidepressants: dry mouth. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1981;290:364-9.
8. Kujirai M, Sawaki K, Kawaguchi M. Inhibitory effect of diazepam on muscarinic receptor–stimulated inositol 1,4,5-trisphosphate production in rat parotid acinar cells. *Br J Pharmacol* 2002;137:945-52.
9. Grégio AMT, Durscki JRC, Lima AAS, Machado MAN, Ignácio SA, Azevedo LR. Association of amitriptyline and diazepam on the histomorphometry of rat parotid glands. *Pharmacologyonline* 2006;2:96-108.

10. de Almeida P del V, Grégio AM, Brancher JA, Ignácio SA, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Effects of antidepressants and benzodiazepines on stimulated salivary flow rate and biochemistry composition of the saliva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:58-65.
11. ZacliKevis MV, D`Agulham AC, Bertassoni LE, Machado MA, de Lima AA, Grégio AM, Azevedo-Alanis, LR. Effects of benzodiazepine and pilocarpine on rat parotid glands: histomorphometric and sialometric study. *Med Chem* 2009;5:74-8.
12. da Silva S, de Azevedo LR, de Lima AA, Ignácio SA, Machado MA, ZacliKevis MV, Grégio AM. Effects of fluoxetine and venlafaxine and pilocarpine on rat parotid glands. *Med Chem* 2009;5:483-90.
13. Klein RM. Development, structure and function of the salivary glands. In: Avery JK. *Oral development and histology*. USA: New York; 2001.p.292-331.
14. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. *Oral anatomy, embryology and histology*. Chicago: Mosby; 2002 p.255-67.
15. Burford-Mason AP, Cummins MM, Brown DH, MacKay AJ, Dardick I. Immunohistochemical analysis of the proliferative capacity of duct and acinar cells during ligation-induced atrophy and subsequent regeneration of rat parotid gland. *J Oral Pathol Med* 1993;22:440-6.
16. Fowler CB, Brannon RB. Subacute necrotizing sialadenitis: report of 7 cases and a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89:600-9.

17. Miguel MC, Andrade ES, Taga R, Pinto LP, Souza LB. Hyperplasia of myoepithelial cells expressing calponin during atrophy of the rat parotid gland induced by duct ligation. *Histochem J* 2002;34:499-506.
18. Morinaga S, Nakajima T, Shimosato Y. Normal and neoplastic myoepithelial cells in salivary glands: an immunohistochemical study. *Hun Pathol* 1987;18:1218-26.
19. Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Tajima Y, Matsuzaki O, Konno A, Kondo Y, Nagao K. Salivary gland malignant myoepithelioma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of ten cases. *Cancer* 1998;83:1292-9.
20. Norberg L, Dardick I, Burford-Mason AP. Differentiating myoepithelial and acinar cells in rat neonatal parotid gland and histogenetic concepts for salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 1996;25:474-80.
21. Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. *Crit Rev Biol Med* 1997;8:51-75.
22. Takahashi S, Schoch S, Walker NI. Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *Int J Exp Pathol* 1998;79:293-301.
23. Zarbo RJ, Prasad AR, Regezi JA, Gown AM, Savera AT. Salivary gland basal cell and canalicular adenomas: immunohistochemical demonstration of myoepithelial cell participation and morphogenetic considerations. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:401-5.

6. Anexos

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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 2 – PROJETO APROVADO PELO CNPq



Diretoria de Programas Temáticos e Setoriais
Coordenação-Geral do Programa de Pesquisa em Saúde
Coordenação do Programa de Pesquisa em Saúde
PROGRAMA BÁSICO DE ODONTOLOGIA

Luciana Reis de Azevedo
Travessa Percy Withers 88 apto 51, Água Verde
80240190 Curitiba-PR

Of. DPH - 01/2005

Brasília, 06 de junho de 2005

Processo: 474790/2004-5 Comitê de Assessoramento: MS Modalidade: 01/04

Referência: Edital CNPq nº 019/2004 - Universal
Instituição: Departamento de Odontologia / Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Projeto: Efeitos de drogas psicotrópicas e da pilocarpina sobre glândulas parótidas de ratos. Análises histomorfométrica, sialométrica e imunohistoquímica

Com base na recomendação do Comitê de Assessoramento e de acordo com o estabelecido no **Edital CNPq nº 019/2004 - Universal**, a Diretoria Executiva do CNPq aprovou a concessão do auxílio financeiro no montante abaixo discriminado. A aplicação dos recursos financeiros deverá ser realizada no prazo máximo de 24 (vinte e quatro) meses a partir da primeira liberação.

Valor Aprovado: R\$ 21.244,10

No anexo 1 estão as orientações para acesso e emissão do Termo de Concessão e Aceitação e para informação da conta vinculada. No anexo 2 está a solicitação de abertura de conta corrente tipo "B" do Tesouro Nacional.

Após a leitura das condições gerais e preenchimento dos itens em branco (exceto data), solicitamos encaminhar ao CNPq três vias, assinadas e rubricadas, do referido Termo dentro do prazo máximo de 15 (quinze) dias a contar desta correspondência. Uma via será restituída após a assinatura pelo CNPq. Caso V. Sa. não devolva o Termo no prazo estipulado, o auxílio será cancelado.

A prestação de contas e o relatório técnico do projeto devem ser apresentados ao CNPq até 60 (sessenta) dias após o término das atividades. Advertimos que a existência de pendência técnica (relatório técnico não remetido) ou financeira (prestação de contas vencida referente a auxílios anteriores), impedem a implementação de auxílios.

Colocamo-nos à disposição para prestar outros esclarecimentos, lembrando que as correspondências deverão ser remetidas para o endereço abaixo, com o nome completo de V.Sa. e número do processo a que se refere.

Atenciosamente,

MANOEL BARRAL NETTO
Diretor de Programas Temáticos e Setoriais

Endereço: SEPN QD.509 BLOCO A - ED.NAZIR I - SALA 105, BRASÍLIA, DF, 70750501

E-mail: COSAU@CNPQ.BR

ANEXO 1: Orientação para emissão do Termo de Concessão e Aceitação, e para informação da conta vinculada.

ANEXO 2: Solicitação de abertura de conta tipo "B".

OBS: O manual de Prestação de Contas encontra-se à disposição de V.Sa. no site do CNPq: <http://www.cnpq.br/formularios/formgerais.htm>

ANEXO 3 – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NO PERIÓDICO Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology

Editorial Office

Dr James R. Hupp, Editor-in-Chief, School of Dentistry, The University of Mississippi Medical Center, Rm D216- 08, 2500 North State St, Jackson, MS 39216-4504; telephone: (601)815-1952; fax: (601)984-4949; e-mail: tripleo@sod.umsmed.edu

Publisher

ELSEVIER INC., 3251 Riverport Lane, Maryland Heights, MO 63043
Issue Manager, Jill Shepherd. Telephone: (352)483-8113; fax: (352)483-3417; e-mail: shepherdja@aol.com

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology On-Line
Manuscript Submission

Submission of Manuscripts. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology uses an online, electronic submission system. By accessing the website <http://ees.elsevier.com/tripleo> authors are stepwise through the creation and uploading of the various files. When submitting a manuscript to the Elsevier Editorial System (EES), authors must provide an electronic version of their manuscript. For this purpose original source files, not PDF files, are required. The author should specify an article type for the manuscript (full length article, review article, case report, etc.), choose a set of classifications from the prescribed list provided online, and suggest the appropriate Journal section. Authors may send queries concerning the submission process, manuscript status, or Journal procedures to the Editorial Office. Once the submission files are uploaded, the system automatically generates an electronic (PDF) proof, which is then used for reviewing. All correspondence, including the Editor's decision and request for revisions will be communicated by e-mail. International authors who are not completely fluent in the English language should seek help in the preparation of their manuscripts. Such assistance will enhance the review, improve the chance of acceptance, and greatly reduce the time until publication if the article is accepted. If your manuscript is accepted, the Editors reserve the right to determine whether it will be published in the print edition or solely in the Internet edition of the Journal. Articles accepted for publication are subject to editorial revision.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the Editor(s) or publisher, and the Editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the Editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication. Neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of such product or service. Duality of Interests. Any commercial or other associations that might create a duality of interests in connection with a submitted manuscript must be disclosed. All sources of external funds supporting the work must be indicated in a footnote, as should all corporate affiliations of the authors including author(s) relationship with a corporate entity involved with the subject of the research or product being espoused in the submission. A cover letter at the time of submission should inform the Editor of pertinent consultancies, stock ownership or other equity interests, or patent licensing arrangements. All information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. If the manuscript is accepted, the Editor will communicate with the authors how best to disclose the relevant information. Publication Standards of Ethical Conduct. Submitting manuscripts for publication that contain elements of fabrication, falsification, or plagiarism constitutes a major violation of the universally accepted standards of ethical and scientific conduct.

Articles falling into the following categories are invited for submission:

Review manuscripts. Manuscripts that review the current status of a given topic, diagnosis, or treatment are encouraged. These manuscripts should not be an exhaustive review of the literature, but rather should be a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography should not necessarily be all-inclusive but rather include only seminal, pertinent, and contemporary references deemed to be most important by the author.

Clinicopathologic Conference. Papers submitted for the Clinicopathologic Conference (CPC) should present interesting, challenging, or unusual cases. The presentation should simulate clinical work-up, including a differential diagnosis. The complete diagnostic evaluation, management, and follow-up must be included. CPC articles will be organized into five parts: Clinical presentation-describe the clinical and imaging characteristics of the lesion. Use clinical photographs and radiographs as appropriate. Differential diagnosis-list and discuss lesions to be considered as reasonable diagnostic possibilities. Diagnosis-histopathologic findings illustrated with photomicrographs. Management-describe the treatment of the patient and response to treatment. Discussion-concentrate on the most interesting aspect(s) of the case.

Medical Management and Pharmacology Update. The Medical Management and Pharmacology Update (MMPU) is intended to provide concise, current reviews of medical problems and how they relate to dentistry. Manuscripts should include a good review of the clinical aspects of the disease, stressing the impact of the disease on the dental management and dental treatment of the patient. Emphasis should be placed on new developments, new research, or new approaches to therapy or management. Manuscripts should not be an exhaustive review of the literature, but rather a review of contemporary thought with respect to the topic. Likewise, the bibliography need not be all inclusive but rather should include only seminal, contemporary references deemed by the author to be most pertinent. The desired format for manuscripts submitted for the MMPU would include: an abstract; topic introduction/overview; epidemiology/demographics; etiology and pathogenesis; clinical presentation/physical findings; diagnosis (laboratory tests, diagnostic imaging, etc.); medical management and treatment; complications; prognosis; oral manifestations/dental implications and significance; and dental management (of patients with the disease). Manuscripts should not exceed 12 pages in 12 point, double-spaced Times New Roman (Tables and Figures count toward the 12-page limit). Pharmacology Update is a component section of MMPU that offers the reader the opportunity to obtain concise information regarding drugs used in the practice of medicine, clinical dentistry and dental specialties. Papers submitted should present clearly and concisely background information regarding the disease or condition that is managed, the indications, rational and approved uses of the specific drugs or class of drugs, the advantages and benefits of the drug or drug class over previous drugs, mechanism of action, criteria for selection, usual dosage, pharmacokinetics, adverse effects, drug interactions, and oral health and dental management considerations. Emphasis should be placed on new developments, effectiveness in clinical trials, therapeutic outcomes and safety. Manuscripts should reflect the contemporary thought with respect to the topic. Use of figures to illustrate the mechanism of action, and tables to presents therapeutic outcomes, drug interactions, and adverse effects are encouraged. Manuscripts should utilize the above mentioned categories for formatting the paper. Papers should not exceed 3000 words. The recommended font is 12 point, double spaced Times New Roman. A maximum of 50 references is recommended.

Clinical Notes. The Clinical Notes feature is intended to provide a forum for brief communications of a technical nature. They are not scientific papers; they may report a new instrument, technique, procedure, or, in rare situations, an interesting case report.

Copyright statement. The specified copyright statement that follows the Information for Authors in each issue of the Journal must be completed, signed by all authors, and faxed to the Editorial Office at (601)984-4949. If not completed in full, it will be returned to the author for completion. The copyright statement may be photocopied for submission or scanned and e-mailed.

Copyright statement. The copyright-transfer document must be downloaded, completed, signed by the responsible author, scanned and attached as a file in the submission process.

Preparation of manuscripts. Only original manuscripts that have not been published in other forms will be considered for publication. Correct preparation of the manuscript by the author will

expedite the reviewing and publication procedures. Manuscripts should be word processed double-spaced. Please note the following requirements and the instructions for online submission at <http://ees.elsevier.com/tripleo> .

The article, including all tables, should be formatted in the latest version of Microsoft Word. The use of appropriate subheadings throughout the body of the text (Methods, Results, and Discussion sections) is required. Legends for figures and tables should appear after the reference list. If an illustration has been taken from published material, the legend must give full credit to the original source. Illustrations must also be submitted electronically as separate files (not embedded). File specifications are listed below in "Illustrations." Tables should be submitted as separate files (in Microsoft Word (*.doc) format.) Routine case reports add little to our knowledge, but good case reports may occasionally be published if they meet certain criteria: (1) are of rare or unusual lesions that need documentation, (2) are well documented cases showing unusual or "atypical" clinical or microscopic features or behavior, or (3) are cases showing good long-term follow-up information, particularly in areas in which good statistics on results of treatment are needed.

Title Page. The title page of the manuscript should include the title of the article, the full name of the author(s), academic degrees, positions, and institutional affiliations. Listed authors should include only those individuals who have made a significant creative contribution. The corresponding author's address, business and home telephone numbers, fax number and e-mail address should be given.

Authorship. All persons who are identified as authors must have made substantial contribution to the manuscript through significantly contributing to the conception, design, analysis or interpretation of data; drafting or significantly revising the manuscript; and providing final approval of the manuscript. All three of these conditions must be met by each author. Persons who contribute to the effort in supporting roles should not be included as authors; rather they should be acknowledged at the end of the paper.

Abstract. An abstract of no more than 150 words, typewritten double-spaced, should precede the introduction to the article and must accompany each manuscript.

Structured abstract. A structured abstract limited to 150 words must be used for data-based research articles. The structured abstract is to contain the following major headings: Objective(s); Study Design; Results; and Conclusion(s). The Objective(s) reflects the purpose of the study, that is, the hypothesis that is being tested. The Study Design should include the setting for the study, the subjects (number and type), the treatment or intervention, and the type of statistical analysis. The Results include the outcome of the study and statistical significance if appropriate. The Conclusion(s) states the significance of the results.

Methods. The methods section should describe in adequate detail the experimental subjects, their important characteristics, and the methods, apparatus, and procedures used so that other researchers can reproduce the experiment. When the paper reports experiments on human subjects, the methods section must indicate that the protocol was reviewed by the appropriate institutional review board (IRB) and that each subject in the project signed a detailed informed consent form.

Animals. Please indicate that protocols were reviewed by the appropriate institutional committee with respect to the humane care and treatment of animals used in the study.

References. References should be cited selectively. Personal communications and unpublished data are not to be cited as references; instead, are to be cited in parentheses at the appropriate place in the text. Make sure all references have been verified and are cited consecutively in the text (not including tables) by superscript numbers. Reference list format must conform to that set forth in "Uniform Requirement for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47). A copy of these Requirements may be viewed/printed online at www.icmje.org. References to articles in press must include authors' surnames and initials, title of article, and name of journal. The reference list should be typed double-spaced on a separate page and numbered in order as the reference citations appear in the text. For journal citations, include surnames and initials of authors, complete title of article,

name of journal (abbreviated according to the Cumulated Index Medicus), year of publication, volume, number, and inclusive page numbers. For book citations, surnames and initials of authors, chapter title (if applicable), editors' surnames and initials, book title, volume number (if applicable), edition number (if applicable), city and full name of publisher, year of publication, and inclusive page numbers of citation.

EXAMPLES (if six or fewer authors, list all; if seven or more list first six and add et al):
Format for periodical references: Pullon PA, McGivney J. Computer utilization in an oral biopsy service. *Int J Oral Surg* 1977;6:251-5.
Format for book references: Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism. London: Churchill Livingstone: 1973; p. 51-6.
Format for chapter references: Hudson FB, Hawcroft J. Duration of treatment in phenylketonuria. In: Seakins J, Saunders R, editors. Treatment of inborn errors of metabolism. London: Churchill Livingstone; 1973. p. 51-6.
Journal article on the Internet: Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs* [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Illustrations. Illustrations should be numbered and provided with suitable legends. A reasonable number of halftone illustrations or line drawings will be reproduced at no cost to the author, but special arrangements must be made with the Editor-in-Chief for color plates, elaborate tables, or extra illustrations. Typewritten or freehand lettering on illustrations is not acceptable. All lettering must be done professionally, and letters should be in proportion to the drawings or photographs on which they appear. Illustrations must be submitted in electronic format. All images should be at least 5 inches wide. Images should be provided in TIF or EPS format, per the instruction for online submission at <http://ees.elsevier.com/tripleo>. Macintosh or PC is acceptable. Graphics software such as Photoshop and Illustrator (not presentation software such as PowerPoint, CorelDraw, or Harvard Graphics) should be used in the creation of the art. Color images need to be CMYK, at least 300 DPI, and be accompanied by a digital color proof, not a color laser print or color photocopy. Note: This proof will be used at press for color reproduction. Gray scale images should be at least 300 DPI accompanied by a proof. Combinations of gray scale and line art should be at least 1200 DPI accompanied by a proof. Line art (black and white or color) should be at least 1200 DPI with a proof.

For best possible reproduction, avoid using shading or dotted patterns; if unavoidable, submit this type of illustration in the form of a glossy photograph for best results. Use thick, solid lines and bold, solid type. Place lettering on a white background; avoid reverse type (white lettering on a dark background). Typewritten or freehand lettering is unacceptable. All lettering must be done professionally and should be in proportion to the drawing graph, or photograph. Do not send original art work, radiograph films, or electrocardiographic strips. Any special instructions regarding sizing should be clearly noted.

Legends to illustrations. Each illustration must be accompanied by a legend. These should be typed double-spaced on a separate page. If an illustration has been taken from published material, the legend must give full credit to the original source.

Tables. The tables should be typewritten double-spaced, including column heads, data and footnotes, and submitted on separate pages. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. All table reference citations should be repeats of numbers assigned within the text, not initial citations. A concise title should be supplied for each table. All columns should carry concise headings describing the data therein. Type all footnotes immediately below the table and define abbreviations. If a table or any data therein have been previously published, a footnote to the table must give full credit to the original source.

Video and Computer Graphics. Authors are encouraged to submit videos and computer-generated graphics; eg, a slide presentation with or without animation and sound. An author who wishes to supply such material should notify the editors in the cover letter and note this intention in the Author Comments area of the online submission. Although the publisher will not edit any video or computer graphic, editors and reviewers may suggest changes. All patient-

identifying information must be removed or masked. The maximum length of a video or computer graphic is 8 minutes. Longer submissions may be divided into smaller clips, each of which should be identified at the beginning of the section (eg, Video Clip 1, Graphic 1). A concise legend for each video clip or computer graphic presentation must be included with the manuscript. Videos are to be submitted in MEG-1 or MPEG-2 (*.mpg) or QuickTime (*.mov) format. More detailed instructions can be found at <http://www.elsevier.com/artwork>. Videos and computer graphics accompanying a manuscript declined for publication will not be accepted separately. If the manuscript is accepted for publication, the presentation will be archived at www.mosby.com/tripleo. **Permissions.** Direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author along with complete information with respect to source. Photographs of identifiable persons must be accompanied by signed releases showing informed consent. Articles appear in both the print and online versions of the journal, and wording should specify permission in all forms and media. Failure to obtain electronic permission rights may result in the images not appearing in the the print or online versions. NOTE: FOLLOW INSTRUCTIONS FOR ONLINE SUBMISSION AT [HTTP://EES.ELSEVIER.COM/TRIPLEO](http://ees.elsevier.com/tripleo)

Announcements. Announcements must be received by the Editorial Office at least ten weeks before the desired month of publication. Items published at no charge include those received from a sponsoring society of the Journal; courses and conferences sponsored by state, regional, or national dental organizations; and programs for the dental profession sponsored by government agencies. All other announcements selected for publication by the Editor carry a charge of \$60 US, and the fee must accompany the request to publish.

Reprints. Because of the extremely high cost of preparing color articles, author reprints for articles containing color illustrations have to be prepared as overprints (overrun pages). Order forms will be sent to the corresponding author of articles containing color illustrations, so that overprints of those articles can be ordered the month of publication. No complimentary overprints or reprints will be provided.

Checklist for authors

- * Signed copyright transfer statement (signed by all authors) (FAXED to Editorial Office)
- * Letter of submission
- * Title page
- * Title of article
- * Full names(s), academic degree(s), affiliation(s) and titles of author(s)
- * Author to whom correspondence, galleys, and reprint request are to be sent, including address and business and home telephone numbers, fax number, and e-mail address
- * Structured abstract (double-spaced)
- * Article proper (double-spaced)
- (Figures and tables should not be part of the text of the manuscript but added as separate files)
- * Statement of IRB review (stated in manuscript)
- * References (double-spaced on a separate page)
- * Reprint requests line (on a separate page)
- * Tables (double-spaced, on separate pages)
- * Legends (double-spaced, on a separate page)
- * Illustrations, properly formatted (as separate files)
- * Video/computer graphics, properly formatted (as separate files)
- * Acknowledgments (on a separate page)
- * Source of funding for research (on a separate page)
- * Signed permission to reproduce previously published material, in all forms and media (scanned in as a file)
- * Signed permission to publish photographs of identifiable persons from the individual specifying permission in all forms and media (scanned in as a file)
- * Financial interest disclosure, if applicable (on a separate page)
- * If this paper was presented at a meeting identification of organization, city, and year (on a separate page)