

Fernanda Ladico Miura

**Alterações salivares em ratos após 5/6 nefrectomia:
Novos biomarcadores salivares para Doença Renal
Crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

UBERLÂNDIA, 2017

Fernanda Ladico Miura

**Alterações salivares em ratos após 5/6 nefrectomia:
Novos biomarcadores salivares para Doença Renal
Crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Banca examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

UBERLÂNDIA, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M685a
2017

Miura, Fernanda Ladico, 1989
Alterações salivares em ratos após 5/6 nefrectomia: novos biomarcadores salivares para doença renal crônica / Fernanda Ladico Miura. - 2017.

71 f. : il.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Rins - Doenças - Teses. 3. Stress oxidativo - Teses. 4. Saúde bucal - Teses. I. Silva, Robinson Sabino da. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº306 – COPOD

Data: 10/02/2017

Discente: Fernanda Ladico Miura Matrícula: 11512ODO006

Título do Trabalho: Alterações salivares em ratos após 5/6 nefrectomia: novos biomarcadores salivares para doença renal crônica.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de Reparo.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Processo de Reparo.

As **quatorze** horas do dia **dez de fevereiro ano de 2017** no Anfiteatro Bloco 8C, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2017, assim composta: Professores Doutores: Luiz Ricardo Goulart Filho (UFU); Fernando Neves Nogueira (USP); e Robinson Sabino da Silva (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) Fernanda Ladico Miura.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dr. Robinson Sabino da Silva apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de argüição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores(as), que passaram a argüir o (a) candidato (a). Após a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato(a) Aprovado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16 horas e 15 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho – UFU

Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira – USP

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva – UFU
Orientador (a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em _____ fevereiro de 2017, considerou a candidata Fernanda Ladico Miura APROVADA.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha avó Marlene Arantes Ribeiro (*in memorian*), que foi meu maior incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e possibilitado conduzi-la com perseverança e coragem para superar as dificuldades do caminho.

Aos meus pais, Aydê e Luiz por viabilizar meus estudos, pelo amor incondicional, pela compreensão e por me mostrar o quanto é bom amar quem nos ama com a mesma intensidade.

Ao meu namorado, Leandro, que ao meu lado me incentivou sendo exemplo responsabilidade e dedicação à profissão. Obrigada pelo amor, companheirismo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Robinson Sabino-Silva, o qual merece toda a minha admiração por sua inteligência, competência e qualidade de trabalho. Obrigada pela paciência em todos os momentos.

Aos meus amigos da Residência, Carlos e Isabela, que doaram um pouco de si para que este trabalho fosse possível. Obrigada pela cumplicidade, amizade e pela convivência diária.

As minhas amigas, Pollyanna, Larissa, Beatriz e Soraya que sempre me incentivaram tanto nos momentos difíceis e quanto nos momentos felizes da minha vida profissional e pessoal. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas e pelo carinho.

Aos alunos de iniciação científica Matheus, Gustavo e Daniele pelo auxílio durante a realização da pesquisa em especial a Dani agradeço por compartilhar comigo muitas horas de cirurgias, fazendo com que elas fossem mais alegres e produtivas.

A equipe do Centro de Fisiologia Integrativa e Nanobiotecnologia Salivar (ICBIM) Léia, Douglas e Emília, que compartilharam todos os seus conhecimentos me auxiliando durante a pesquisa. Obrigada por tornarem a realização deste trabalho possível.

A professora Liliane Tannús, por facilitar o caminho para chegar até aqui. Obrigada pela compreensão e auxílio durante esse momento.

Aos Cirurgiões Dentistas do Hospital do Câncer de Uberlândia, Cizelene, Luiz Fernando, Dhiancarlo, Damillys e Cibeli, pelo convívio, aprendizado e seriedade com que trabalham.

A equipe do Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular – CPBio da FOUFU pelo apoio na realização da técnica de FTIR.

Ao Professor Foued Salmen Espíndola e membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pelo apoio na avaliação do estresse oxidativo.

Aos Funcionários da FOUFU, pelo compromisso com que conduziram todos esses anos.

A FOUFU pela qualidade de ensino proporcionada.

Ao Instituto de Ciência Biomédicas da UFU (ICBIM), ao Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI), por terem sido parte fundamental para realização deste trabalho.

Ao CNPQ e a Fapemig pelo apoio financeiro à pesquisa.

É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.

Chico Xavier.

SUMÁRIO

RESUMO	13
INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	15
OBJETIVO	24
MATERIAIS E MÉTODO	25
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	49
CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC – Doença Renal Crônica

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

TEA – Taxa de Excreção de albumina

TAC – Taxa de Albumina – Creatinina

ml/min – Mililitro por Minuto

mg/dl – Miligrama por decilitro

mg/g – Miligrama por Grama

PA – Pressão Arterial

DP – Doença Periodontal

Na+/glicose/água – Sódio por Glicose por Água

SGLT1 – Co-transportador de Na+/Glicose 1

SLC2A1 – Gene da família 2 dos carreadores de soluto Solute Membro 1

Na+ – Sódio

Na+/K+/ATPase – Bomba de Sódio/ Potássio ATPase

TNF- α – Tumor necrosis factor

IL-1 β – Interleucina 1 Beta

γ -INF – Interferon Gama

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

ACh – Acetilcolina

M1 – Muscarínico 1

M3 – Muscarinico 3

PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-Bisfosfato

IP3 – Inositol Trifosfato

AQP – Aquaporina

Cl⁻ – Cloreto

HCO₃⁻ – Bicarbonato

AQP 4 – Aquaporina 4

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

ROS – Espécies de Oxigênio Reativo

Cat – Catalase

GPx – GlutationaPeroxidase

H₂O₂ – Água oxigenada

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência Animal

CEUA/UFU – Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade Federal de Uberlândia

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

mg/kg – Miligrama por Kilo

mg – Miligrama

µL – Milcrolitro

i.p. – Intraperitoneal

EPM – Erro Padrão Médio

ANOVA – Análise de Variância

g – Gramas

p – Probabilidade

cm – Centrimétreo

IgA – Imunoglobulina A

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

FRAP – Ferrec Reducing Antioxidant

GSH – Glutationa

Curva ROC – Receiver operator characteristic curve

PBS – Phosphate buffered saline

AUC – Área sobre a Curva

nm – Nanômetro

nmol – nanoMolar

nmol/mg – nanoMolar por Miligrama

µM – microMolar

UV - Ultravioleta

RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) é considerada um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo e tem demonstrado alterações na saúde bucal. O presente estudo investigou os efeitos da DRC sobre a secreção salivar em ratos. Foram utilizados ratos Wistar com 8 semanas de idades, os quais foram divididos em grupos controle, sham e DRC. Após 6 semanas de indução da DRC por meio de nefrectomia 5/6, os ratos foram anestesiados e a saliva não estimulada e estimulada (pilocarpina) foram coletadas em conjunto com as glândulas salivares. Em glândulas submandibulares foi avaliado o estresse oxidativo por meio da peroxidação lipídica avaliada pela formação do subproduto malondialdeido (TBARS) e as atividades da catalase, FRAP e GSH. O perfil químico e as concentrações de amilase, IgA, cortisol e proteínas totais da saliva estimulada foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A análise de ROC foi realizada para determinar a capacidade de diagnóstico de cada biomarcador salivar para DRC. Os dados demonstraram que o peso corporal permaneceu inalterado na DRC comparado ao grupo controle e sham. O consumo de água, a uremia e o peso do rim aumentaram ($P<0,05$) na DRC comparado ao grupo controle e sham após 6 semanas. O fluxo salivar estimulado por pilocarpina e o peso das glândulas salivares foram semelhantes ($P<0,05$) nos ratos controles, sham e DRC. No entanto, o fluxo salivar não estimulado foi reduzido ($P<0,05$) na DRC em relação ao controles e sham. A peroxidação lipídica (TBARS) e a atividade glutationa peroxidase em glândulas submandibulares aumentou na DRC em comparação com controle e sham ($P<0,05$). A análise da espectroscopia FTIR demonstrou que a concentração de cortisol foi aumentada e a de IgA foi reduzida na DRC em comparação com controles e sham. A análise do potencial diagnóstico do cortisol salivar teve sensibilidade 88,9% e especificidade de 80% ($ROC=0,911$) ($P<0,05$); enquanto que da IgA salivar teve sensibilidade de 87,5% e especificidade de 100% ($ROC=0,975$) ($P<0,05$). Em conjunto, demonstramos que animais DRC apresentam fluxo salivar não estimulado reduzido e estresse oxidativo aumentado na glândula submandibular. Adicionalmente, evidenciamos que o cortisol salivar e a IgA mensurados por espectroscopia FTIR apresentam grande potencial como biomarcadores para a doença renal crônica.

Palavras – Chave: Doença Renal Crônica, Biomarcadores salivares, SGLT1, estresse oxidativo, fluido diagnóstico, IgA, Cortisol.

ABSTRACT

Chronic Kidney Disease (CKD) is considered a serious public health problem in Brazil and worldwide and has shown changes in oral health. The present study investigated the effects of CKD on salivary secretion in rats. Wistar rats at 4 weeks of age were used, which were divided into control, sham and CKD groups. After 6 weeks of CKD induction, non-stimulated and pilocarpine-stimulated salivary flow rates were measured in anesthetized rats. After that, salivary glands were removed. Oxidative stress levels, glutathione antioxidant defense system and antioxidant status were analyzed in submandibular glands. The spectroscopy profile and concentrations of alpha-amylase, IgA, cortisol and total proteins of stimulated saliva were analyzed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Receptor Operation Characteristic Curve (ROC) analysis was performed to determine the diagnostic capacity of each salivary biomarker for CKD. The data demonstrated that body weight remained unchanged in CKD compared to the controls and sham rats. Water consumption, uremia, and kidney weight increased ($P<0.05$) in CKD compared to controls and sham rats. Pilocarpine-stimulated salivary flow and salivary glands weights were similar ($P<0.05$) in DRC, controls and sham rats. Non-stimulated salivary flow was reduced ($P<0.05$) in CKD than controls and sham rats. CKD increased the oxidative stress levels and the activity of FRAP and GSH in submandibular glands when compared to controls and sham rats. Salivary cortisol concentration was increased in CKD rats than controls and sham rats. Differently, salivary IgA was decreased in CKD condition. Diagnostic potential of salivary cortisol provided sensitivity of 88.9% and specificity of 80% ($ROC = 0.911$) ($P<0.05$) and; salivary IgA provided sensitivity of 87.5% and specificity of 100% ($ROC = 0.975$) ($P<0.05$). In addition, we have shown that salivary cortisol and IgA measured by FTIR spectroscopy present great potential as biomarkers for chronic renal disease..

Keywords: Chronic Kidney Disease; Salivary Biomarkers; SGLT1, oxidative stress, diagnostic fluid, IgA, Cortisol.

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Os rins são órgãos que desempenham uma função muito difundida que é a excreção dos produtos de degradação que são ingeridos ou produzidos pelo metabolismo nitrogenado (ureia, ácido úrico, fosfatos, sulfatos), desta forma, dependem do processo de filtração glomerular. Além disto, os rins desempenham a função vital de manter a concentração do meio interno por meio da regulação do volume e da composição dos líquidos corporais, apesar de uma ingestão de solutos e água muito diferente ao longo do tempo. Os rins também apresentam função no equilíbrio ácido-base e uma função endócrina com atuação na produção de vitamina D, eritropoietina, renina e pelo catabolismo e regulação de outros hormônios (Rennke et al., 1978; de Santo et al., 1997; Martin et al., 2005).

O néfron é a unidade funcional dos rins, sendo que cada rim humano é constituído de cerca de um milhão de néfrons. Cada néfron apresenta um componente filtrante e um componente tubular. O componente filtrante é chamado de corpúsculo renal e é formado pelo glomérulo, local de ultrafiltração do plasma, e pela cápsula de Bowman, local de onde o filtrado se dirige ao componente tubular (túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor). Para completar o processo de formação da urina, o ultrafiltrado pode ser modificado pela reabsorção de água e solutos que se dirigem novamente ao sangue e, também, pela secreção de substâncias provenientes do sangue peritubular. Neste processo, o sangue é filtrado dos capilares glomerulares e a água, compostos não proteicos e proteicos de baixo peso molecular são transportados para a cápsula de Bowman. Por outro lado, as células sanguíneas e proteínas, de alto peso molecular permanecem no leito capilar (Knepper et al., 1983).

Considerando que os rins são órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase do corpo humano, constatamos que a diminuição progressiva da função renal pode estar associada ao comprometimento de todos os outros órgãos (Bastos et al., 2010).

A Doença renal crônica (DRC) é um termo geral para desordens heterogêneas que afetam a estrutura e a função renal, presentes durante mais de 3 meses e com implicações para a saúde. A DRC é classificada de acordo com os estágios de severidade da doença, que podem ser avaliados pela taxa de filtração glomerular (TFG), albuminúria e dados clínicos (Levey et al., 2012; Stevens et al., 2013).

A DRC também é definida pela *National Kidney Foundation* (Stevens et al., 2013) como a presença de uma $\text{TFG} < 60\text{mL/min}/1,73\text{m}^2$ por um período maior ou igual a 3 meses, com ou sem a lesão renal (Levey et al., 2012; Stevens et al., 2013). Os estágios de classificação da doença são apresentados de acordo com a tabela abaixo (Tabela 1, Stevens et al., 2013):

Tabela 1: Estágios de classificação da Doença Renal Crônica. TFG – Taxa de Filtração Glomerular; TEA – Taxa de Excreção de albumina; TAC – Taxa de Albumina/Creatinina; *Relativo para jovens adultos; **Na ausência de evidência de dano renal com a categoria Estágio 1 e Estágio 2 não satisfazendo aos critérios para DRC; *** Inclui a Síndrome Nefrótica (TEA usual $>2200\text{mg/d}$ [$\text{TAC}>2220\text{ mg/g}$]). .

TFG	TFG, mL/min por $1,73\text{m}^2$	TEA, mg/d	TAC, mg/g	Descrição
Estágio 1	≥ 90	-	-	Normal ou TFG levemente aumentada
Estágio 2	69-89	-	-	Lesão renal com leve redução da TFG*, **.
Estágio 3a	45-59	-	-	Lesão renal com moderada redução da TFG
Estágio 3b	30-44	-	-	Lesão renal com moderada ou severa redução da TFG
Estágio 4	15-29	-	-	Lesão renal com severa TFG
Estágio 5	<15	-	-	Falência renal funcional
<hr/>				
Albuminúria				
A1	-	<30	<30	Normal ou levemente aumentada
A2	-	30-300	30-300	Moderadamente aumentada *
A3	-	>300	>300	Severamente aumentada ***

Diversos estudos indicam que alguns pacientes são mais susceptíveis a desenvolver DRC, como os hipertensos, diabéticos, idosos, familiares de portadores de DRC e pacientes que utilizam medicações nefrotóxicas (Bastos et al., 2010; Hall et al., 2014; Lankarani et al., 2017).

A hipertensão arterial e o diabetes causam complicações microvasculares, entre elas a progressão da lesão renal (Giunti et al., 2006). Os pacientes que apresentam hipertensão arterial sistêmica, por longo período e de forma não controlada, possuem maior risco de desenvolver a DRC. A persistência de níveis elevados de pressão arterial (PA) pode promover alterações estruturais progressivas nas artérias e arteríolas renais e dessa forma contribui para o aumento da pressão hidrostática intraluminal (Nunes, 2007; Agarwal 2009).

Já a DRC associada ao diabetes é resultado da interação de fatores genéticos, ambientais, metabólicos e hemodinâmicos, que em conjunto, atuam causando o enfraquecimento da membrana basal glomerular, a expansão da matriz mesangial, diminuindo o número de podócitos e promovendo glomeruloesclerose associada a fibrose túbulo intersticial (Giunti et al., 2006).

Atualmente, a DRC é considerada um problema de Saúde Pública no Brasil e no mundo (Silva et al., 2015), o que se deve ao rápido aumento da sua prevalência nos últimos anos, com o agravante de que a maioria dos casos não é diagnosticado nas fases iniciais da doença, no Brasil aproximadamente 10 milhões de pessoas possuem algum grau de alteração renal e no mundo mais de um milhão de pessoas morrem anualmente (Silva et al., 2016). Considerando que em geral, a DRC é uma doença que nos estágios iniciais é silenciosa. Dessa forma o portador da doença não apresenta sinais ou sintomas que o alertem para a presença da doença, o que retarda a sua detecção, com grandes impactos sobre a eficácia dos tratamentos e no prognóstico (Kirsztajn et al., 2011).

A ativação do sistema nervoso simpático é comum em pacientes portadores de DRC e isto apresenta papel importante na gênese da hipertensão arterial e na progressão dos estágios da DRC. A ativação adrenérgica, baseada em avaliações das concentrações plasmáticas de norepinefrina e microneurografia do nervo peroneal, já pode ser detectada nos estágios iniciais

da doença mas parece estar aumentada em estágios mais avançados (Grassi et al., 2011; Mancia et al., 1999; Zilch et al., 2007). A atividade simpática dirigida a órgãos específicos, como as glândulas salivares, ainda não está claramente estabelecida.

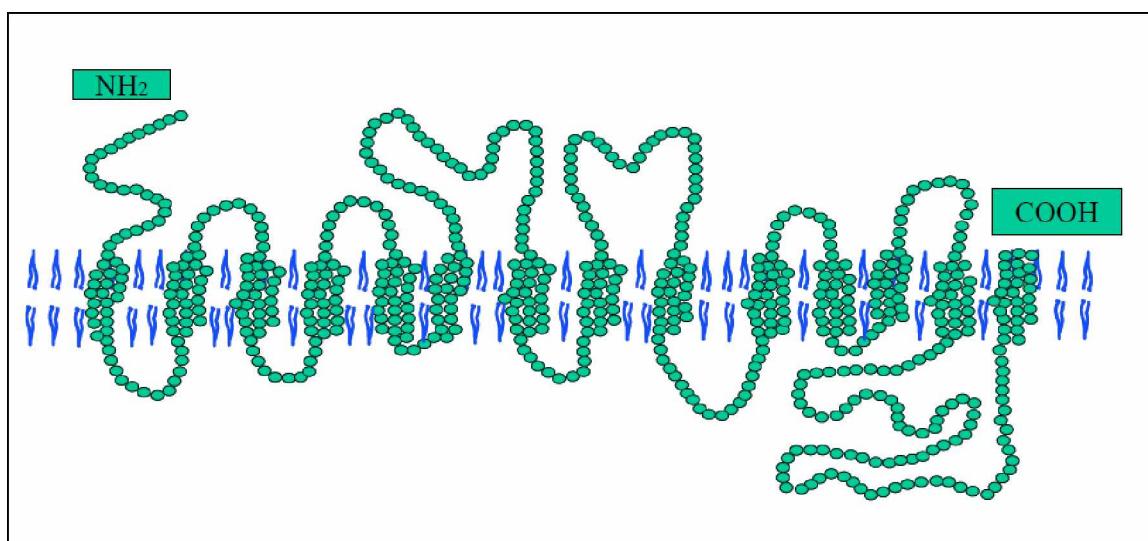
Além das complicações sistêmicas, na grande maioria destes pacientes tem sido relatado à presença de alterações na cavidade oral. Entre as alterações orais frequentes da DRC estão a palidez da mucosa bucal, hipoplasia do esmalte, xerostomia, odor urêmico e alterações no paladar (Kho et al., 1999; Popovska et al., 2013). Pacientes com DRC em tratamento de hemodiálise também podem apresentar alterações e deficiências imunológicas, o que torna o acúmulo de placa bacteriana um fator de risco a doença periodontal (DP), e esta apresenta-se como um fator de risco a infecções sistêmicas (Loria, 2013) que podem comprometer o transplante renal (Loria, 2013; Kaushik et al., 2013). O aumento do acúmulo da placa bacteriana pode estar relacionado a redução do fluxo salivar nesses pacientes, que pode ser causada pela própria doença, por estresse ou ansiedade, ou até mesmo pelos medicamentos ingeridos (Loria, 2013).

A xerostomia é definida como a sensação subjetiva de boca seca. Esse sintoma pode estar associado com redução do fluxo salivar, uso de medicamentos, restrição de ingestão de fluidos e idade (Bossola et al., 2012). A concentração de creatinina, ureia, sódio, potássio, cloreto e alfa-amilase foram significativamente maiores nos pacientes portadores de DRC do que em indivíduos saudáveis. Por outro lado, a concentração de cálcio foi significativamente menor nos portadores de DRC (Tomás et al., 2008). Recentemente, também foi demonstrada redução da atividade da amilase salivar e aumento da concentração de ureia salivar em animais portadores de DRC induzida por nefrectomia 5/6 (8 semanas após a indução de DRC) na saliva induzida por meio de isoproterenol e por pilocarpina (Romero et al., 2016).

Na última década, foi bem caracterizada a presença de uma proteína cotransportadora de Na^+ /glicose/água tipo 1 (SGLT1) com papel importante no transporte de água em ductos de glândulas salivares. A proteína SGLT1 é codificada pelo gene SLC2A1 e tem seu transporte acoplado com 264 moléculas

de água durante o ciclo de passagem dos 2 íons Na^+ e uma molécula de glicose (Zeuthen, 2000; Wright et al., 2011). O cotransporte de SGLT1 é chamado de transporte ativo secundário, porque a força motriz gerada pelo gradiente de sódio é mantida pela ativação primária da bomba Na^+/K^+ /ATPase na membrana basolateral. Desta maneira, sabe-se que o fluxo é sempre em direção ao meio intracelular (Wright et al., 2011). O SGLT1 é composto por 14 segmentos transmembrânicos com a face N-terminal voltada ao interstício e a face C-terminal dentro da membrana plasmática (Figura 1).

FIGURA 1 - Estrutura secundária da proteína SGLT1. Modelo modificado de Wright e Turk, 2004.



Nosso grupo de pesquisa verificou correlação negativa entre os níveis de SGLT1 na membrana luminal com o fluxo salivar não-estimulado (Sabino-Silva et al., 2009; Sabino-Silva et al., 2010; Sabino-Silva et al., 2013). Em glândulas salivares de animais com doença renal crônica ainda não foram realizadas análises do SGLT1.

Em pacientes em tratamento com hemodiálise, a xerostomia pode estar associada aos seguintes problemas: dificuldade na mastigação, deglutição, paladar e a fala; aumento do risco de doenças bucais, incluindo lesões na mucosa, gengiva e língua, infecções fúngicas, cárie dentária e doença periodontal. Porém mais esforços devem ser feitos para fornecer uma melhor

compreensão da relação entre estas alterações orais com a diminuição da secreção salivar (Bossola et al., 2012).

A saliva total é caracterizada por uma mistura de fluidos secretados pelas glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual), e também pelas glândulas menores e do fluido gengival associados com detritos celulares e microorganismos da cavidade oral (Kaufman et al., 2002). Estudos demonstraram que pacientes com DRC apresentam aumento do pH da saliva e elevadas concentrações de cálcio, fosfato, ureia (Mancini, 2005), potássio, cloreto, alfa-amilase (Tomás et al 2008) fosfato e albumina (Rodrigues et al 2016). Além disso apresentam redução da concentração de cálcio salivar (Tomás et al 2008) e da presença de componentes inflamatórios na saliva (TNF- α), interleucina (IL-1 β), γ -interferon (γ -INF), IL-6, IL-8 (Thorman et al., 2010).

A secreção salivar é coordenada pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. O estímulo da inervação parassimpática para as glândulas salivares é realizado pela acetilcolina (ACh). A ACh se liga principalmente a receptores muscarínicos dos tipos M1 e M3, presentes na membrana basolateral das células acinosas. Essa ligação promove uma mudança conformacional no receptor que ativa uma proteína G ligada. A subunidade α da proteína G ativada promove a estimulação da fosfolipase C que, por sua vez, atua sobre o fosfatidilinositol (PIP2 – fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato), um componente ancorado na parte interna da membrana plasmática, gerando inositol trifosfato (IP3) (Tanimura et al., 1999). O IP3 se dissocia no citoplasma da célula em direção ao retículo endoplasmático, o que promove liberação de íons cálcio. O aumento de cálcio no meio intracelular ativa a abertura de canais de cloreto, na membrana luminal, e de canais de potássio, na membrana basolateral. Além disto, o aumento de cálcio intracelular promove a inserção de proteínas tipo Aquaporina (AQP) nas membranas basolateral e luminal. O efluxo de cloreto dentro do lúmen atrai íons sódio, transportado via paracelular, bem como moléculas de água (via paracelular e transcelular). O gradiente osmótico gera a secreção do fluido, o que forma a saliva primária (Humphrey et al., 2001; Turner et al., 2001). Posteriormente, quando o fluido primário passa pelos ductos ocorre reabsorção de íons Na $^+$ e Cl $^-$, e secreção de K $^+$ e HCO3 $^-$ (estágio 2) (Thaysen et al., 1954).

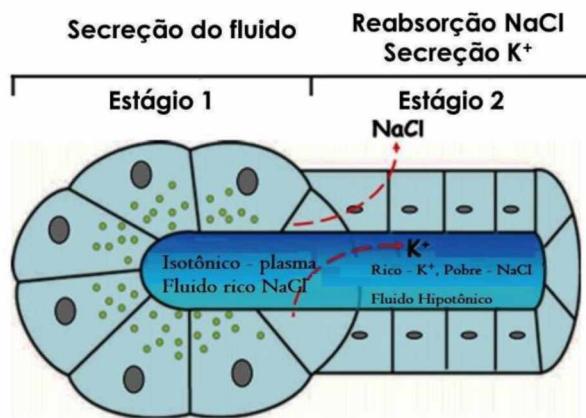


FIGURA 2 - Formação do fluido salivar. Modelo adaptado de CATALÁN et al., 2009.

Considerando que a reabsorção de Na^+ e Cl^- excede a secreção de K^+ e HCO_3^- e fisiologicamente espera-se não ocorrer significativa movimentação de água no sistema ductal, a saliva final secretada na cavidade oral é hipotônica em relação ao plasma em situações fisiológicas (Melvin et al., 2005). No entanto, trabalhos recentes permitem questionar a ausência de movimentação de água nos ductos salivares. O epitélio ductal sempre foi considerado um território de permeabilidade muito baixa para a água (Martinez, 1987), ou até impermeável (Turner et al., 2002). No entanto, é imprescindível destacar que a permeabilidade não foi avaliada em modelos experimentais que apresentam hiposalivação. Além disso, os experimentos originais de microperfusão de glândulas salivares foram realizados nas décadas de 60 e 70 (Young, 1968; Young et al., 1970; Mangos et al., 1973) e não tem sido revalidados nas últimas décadas. Em células ductais de glândulas salivares foi demonstrado que o aumento de SGLT1 na membrana luminal de ratos diabéticos e/ou hipertensos, estava relacionado com a redução da secreção salivar não-estimulada (Sabino-Silva et al., 2009; Sabino-Silva et al., 2013). Além disso, foi demonstrada a presença do transportador de água, Aquaporina tipo 4 (AQP 4) em membrana basolateral de glândulas salivares (Frigeri et al., 1995).

A coleta da saliva pode ser feita de forma estimulada ou não estimulada. A estimulação da produção de saliva pode ser feita de forma mecânica ou química. Sabendo-se que o tipo de estimulação afeta a quantidade da saliva

produzida, denota-se que alguns de seus constituintes são também modificados (Mandel, 1990). A coleta de saliva não estimulada é realizada sem estímulos exógenos conhecidos (Kaufman, 2002).

O estresse oxidativo demonstra um desequilíbrio entre a capacidade oxidante e antioxidant. Sabe-se que aumento do estresse oxidativo está associado ao desenvolvimento e a progressão das complicações do diabetes e da hipertensão arterial (Baynes et al., 1991), porém não encontramos descrição da relação entre o estresse oxidativo em glândulas submandibulares com a doença renal crônica (DRC). A produção excessiva de radicais livres ou o desequilíbrio entre compostos antioxidantes e oxidantes, produzido pelo estresse oxidativo, possibilita a oxidação de biomoléculas seguida pela perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, e consequentemente o dano oxidativo contra células e tecidos pode ocasionar danos irreversíveis ou morte celular (Halliwell e Whiteman, 2004).

Considerando que a presença de radicais livres possui potencial de causar danos ao organismo, para evitar a formação desses radicais o organismo possui inúmeros mecanismos de defesa, que possuem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radical, que podem ser divididas em enzimáticas e não enzimáticas (Barbosa, 2010). Entre as enzimas do sistema de defesa, sabe-se que a catalase (Cat), a superóxido dismutase e Glutathione Peroxidase (GPx) são enzimas que podem impedir e/ou controlar a formação de radicais livres e espécies não-radical (Schneider e Oliveira, 2004; Powers e Jackson, 2008; Prasad et al., 2007).

A análise dos constituintes químicos e celulares do sangue são os procedimentos laboratoriais mais utilizados com fins de diagnóstico, uma variedade de estudos tem avaliado o potencial da saliva como fluido biológico útil nos exames para diagnóstico de doenças sistêmicas ou orais (Moura et al, 2007), esse interesse se deve ao fato de que a saliva pode ser facilmente coletada quando comparada à coleta de sangue (Lima 1999; Moura, 2007).

Há muitas vantagens de usar saliva como um líquido de diagnóstico. A coleta de saliva é rápida, fácil, barata e não invasiva (Kaczor-Urbanowicz et al

2016). Este fluido oral é fácil de armazenar, enviar, não coagula e pode refletir o estado fisiopatológico atual de cada indivíduo com nível reduzido de ansiedade (Bossola et al., 2012). Outro fator importante para utilização da saliva como fluido de diagnóstico é o menor risco de contaminação para o operador quando comparado ao risco durante a utilização do sangue (Moura et al., 2007). Em conjunto a esses benefícios estudos tem comprovado que a saliva é um método confiável, quando comparado com outros métodos de diagnóstico, como dosagens sanguíneas de substâncias, o que tem tornado a aplicabilidade da saliva importante (Moura et al., 2007; Schwartz et al. 1995; Lawrence, 2002; López et al., 2003; Yarat et al., 2004).

A saliva pode refletir características locais e gerais e, portanto, tem potencial para ser utilizada na detecção de biomarcadores para doenças orais e sistêmicas (Bossola et al., 2012, Kaufman et al., 2002). Um amplo conjunto de métodos usados para analisar a saliva inclui imunoensaio, enzimático colorimétrico, ensaio cinético, cromatográfico e espectroscopia de massa que requerem reagentes de alto custo (Khaustova et al., 2010).

A espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) é um método excelente para análise de amostras biológicas (Baker et al., 2014) possibilitando avaliar diversos componentes químicos e proteínas específicas com alta precisão sem requerer reagentes (Khaustova et al., 2010). O método estuda as interações energéticas dos compostos químicos, através da utilização de uma fonte de energia de luz que possui uma frequência fixa (Pereira, 2003). Nos últimos anos tem sido uma importante ferramenta para diagnóstico de fluidos corporais (Ahmed et al., 2010), e pode ser utilizada para identificação de componentes de uma mistura desconhecida (Ahmed et al., 2010). O FTIR permite por meio da passagem de dados espectrais a construção de imagens realizadas a partir de espectros de impressões digitais, podendo refletir um estado de saúde subjacente da amostra em análise (Baker et al., 2014). Em conjunto a utilização do FTIR com o potencial da utilização da saliva como fluido diagnóstico possibilitam que diversas patologias possam ser analisadas (Pereira, 2003) assim como a DRC.

OBJETIVO

O presente trabalho tem o objetivo de investigar os efeitos da Doença Renal Crônica pelo modelo animal de nefrectomia 5/6 na secreção salivar não estimulada e estimulada, no estresse oxidativo e na caracterização do perfil salivar utilizando espectroscopia FTIR.

Objetivos específicos:

- Analisar o volume da secreção salivar não estimulada e estimulada por pilocarpina;
- Avaliar a presença do SGLT1 na membrana luminal de células ductais de glândulas submandibulares;
- Analisar a presença do estresse oxidativo e parte do sistema antioxidativo por meio de atividade enzimática;
- Caracterizar o perfil salivar, composição de IgA, amilase, cortisol e proteínas totais por meio de espectroscopia FTIR;
- Correlacionar componentes salivares com a concentração de creatinina plasmática;
- Buscar novos biomarcadores salivares para a DRC.

MATERIAIS E MÉTODO

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da Sociedade Brasileira de Ciência Animal (SBCAL). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFU) (Licença 092/2015), de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

ANIMAIS

Foram utilizados Ratos Wistar machos com 8-10 semanas pesando cerca de 300g obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram acondicionados no Biotério setorial do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde nas seguintes condições: a) ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, b) temperatura ambiente 22 ± 2 °C; e c) oferta plena de água e ração para roedores. Para minimizar os efeitos circadianos, todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 10:00 e 12:00 horas.

Foram estudados os seguintes animais com 3 meses (Figura 3):

- a) Controle (n=8):** ratos de 3 meses que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico.
- b) Sham (n=9):** ratos de 3 meses que receberam simulação de cirurgia para remoção renal tipo 5/6;
- c) Doença renal crônica (DRC)(n=10):** ratos de 3 meses que receberam cirurgia para remoção renal tipo 5/6 segundo protocolo abaixo;

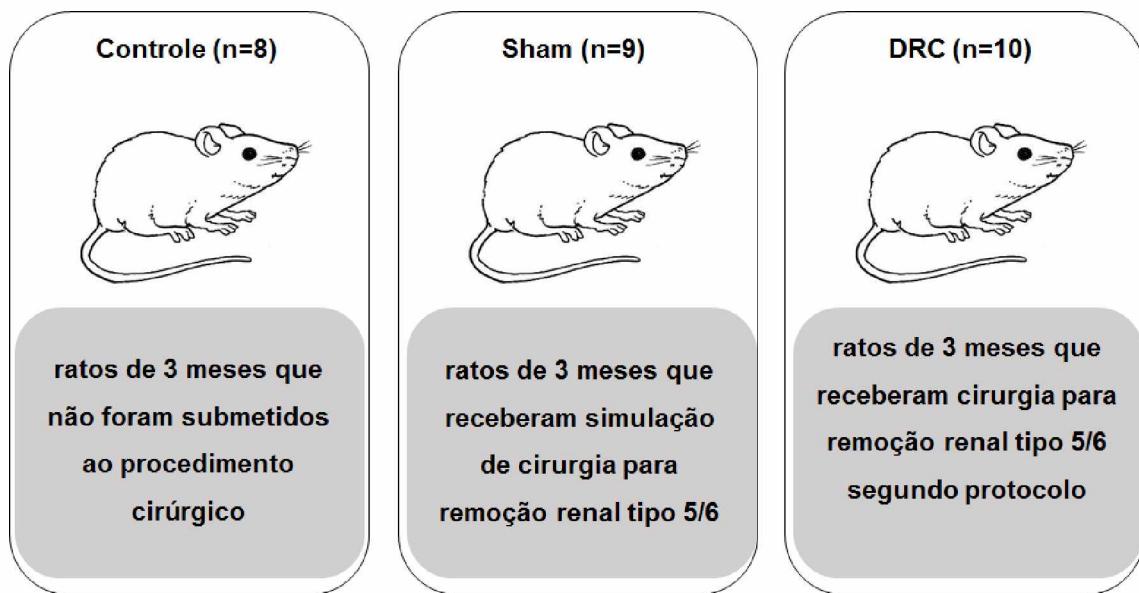


Figura 3: Grupo experimentais estudados

MODELO EXPERIMENTAL

Para a indução de IRC os animais foram submetidos à ablação de 5/6 da massa renal sob anestesia intraperitoneal realizada com cetamina 80 mg/kg e xilazina 12 mg/kg (intraperitoneal). Após a laparotomia, os pedículos renais foram expostos e foi realizada nefrectomia direita. A seguir foi realizado uma ligadura de 2 ramificações da artéria renal esquerda com fio mononylon 6-0. Os animais foram estudados 45 dias após a nefrectomia (Figura 4) (Bergamaschi et al., 1997).

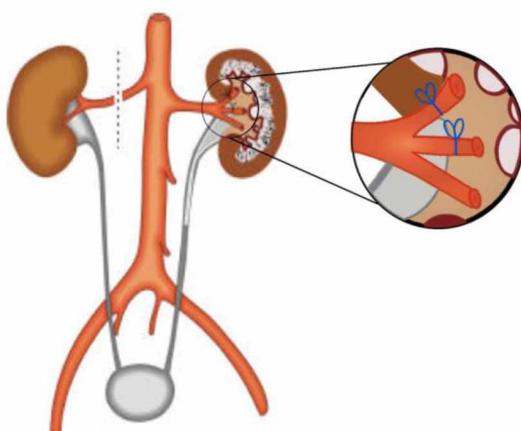


Figura 4: Modelo experimental de indução da Nefropatia Crônica. (Imagen modificada) (Shimizu, 2005; Romero, 2013)

Os animais foram alocados em metabólicas por um período de 12 horas, após 15, 30 e 45 dias de indução da doença renal crônica. Nesse período foi realizada a coleta de urina e do volume de consumo de água pelos animais. E após 45 dias eram coletadas as amostras e os animais sacrificados. Todas as drogas e reagentes foram adquiridos a Sigma Chemical (St. Louis, Mo, EUA) (Figura 4).

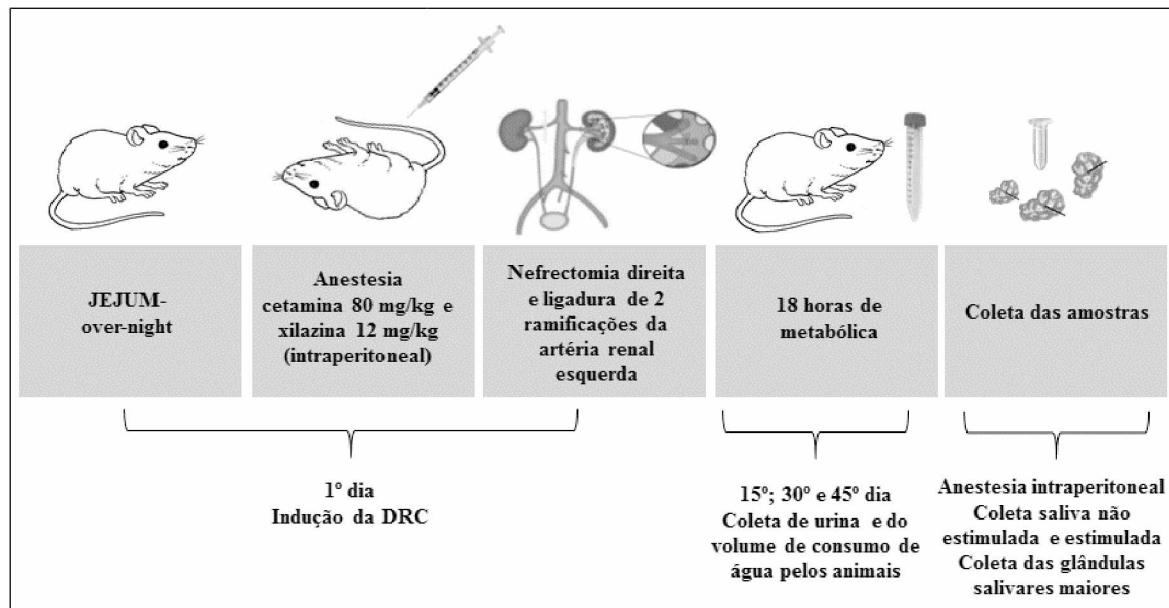


Figura 4: Modelo experimental do estudo

PESO CORPORAL

O peso corporal dos ratos dos grupos controle, sham e DRC foram verificados no dia da cirurgia e 45 após a indução da DRC.

COLETA DE SALIVA NÃO ESTIMULADA

Os animais após anestesiados com cetamina 80 mg/kg e xilazina 12 mg/kg (intraperitoneal) tiveram a secreção salivar não estimulada mensurada após 7 minutos de coleta (Figura 5), utilizando quatro bolas de algodão pré-pesadas e inseridas na cavidade oral dos animais, duas na região abaixo da língua e duas na região bilateral próximas aos dentes. O volume final foi calculado pela subtração do peso final (peso úmido) menos o peso inicial (peso

seco) das quatro bolas de algodão e considerando 1mg correspondente a 1 μ L (Sabino-Silva et al., 2009).

$$\text{Fluxo salivar} = \text{peso úmido} - \text{peso seco}$$



Figura 5: Esquema de distribuição dos grupos experimentais para coleta de saliva não estimulada.

COLETA DE SALIVA SOB ESTÍMULO PARASSIMPÁTICO

Os ratos anestesiados cetamina 80 mg/kg e xilazina 12 mg/kg (intraperitoneal) e colocados sobre uma mesa cirúrgica mantida em 36,5 °C. A temperatura do animal foi mensurada por termômetro retal e mantida entre 36,5 °C e 37 °C. Após uma incisão medial na região ventral do animal foi inserida uma cânula (PE-250, Critchley, Austrália) na traquéia do animal, para facilitar os movimentos respiratórios. Em seguida foi realizada a estimulação da secreção salivar através do estímulo farmacológico com pilocarpina (2 mg/Kg de peso corpóreo, i.p., Takai et al., 1983). A saliva foi coletada durante 10 minutos após o início da sua secreção (Figura 6). O volume de saliva foi calculado considerando a diferença de peso de “ependorfs” antes e após a coleta da saliva.

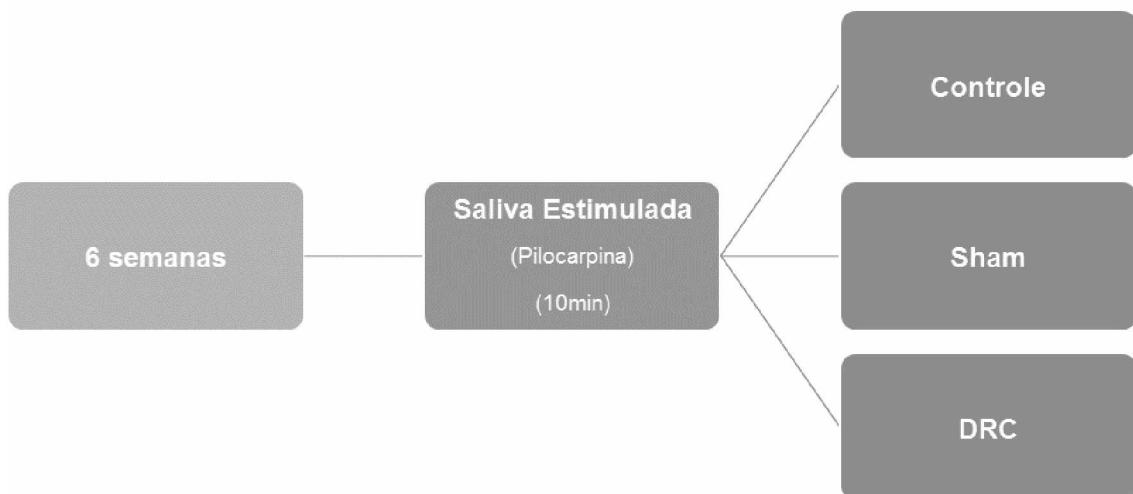


Figura 6: Esquema de distribuição dos grupos experimentais para coleta de saliva estimulada.

PESO DO RIM REMANESCENTE

No final dos experimentos, os ratos foram eutanizados com uma sobredosagem de tiopental sódico, e o rim remanescente foi removido. O tecido adjacente do rim foi descartado, e os rins remanescentes foram pesados. Os rins de animais sham e de Controle foram submetidos ao mesmo procedimento.

AVALIAÇÃO DE COMPONENTES SALIVARES POR MEIO DE FTIR

Considerando que a espectroscopia no infravermelho é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente, foi avaliada a composição da glândula submandibular e da saliva coletada por estímulo parassimpático pelo espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em regiões com espectro eletromagnético entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} (Khaustova et al., 2010). A unidade de material de cristal em unidade ATR era um disco de diamante como elemento de reflexão interna. A profundidade de penetração da amostra varia entre $0,1$ e $2\text{ }\mu\text{m}$ e depende do comprimento de onda, do índice de refracção do material de cristal ATR e do ângulo de incidência do feixe. No cristal ATR o feixe infravermelho é refletido na interface em direção à amostra. Cinquenta μl de saliva foram liofilizados utilizando um Speed-Vac (Thermo Savant, San Jose, CA) para obter espectros de amostra. O espectro de

ar foi utilizado como pano de fundo na análise FTIR. O espectro de saliva foi tomado com 4 cm^{-1} de resolução e 32 varreduras foram realizadas para análise de amostra (Khaustova et al., 2010).

A definição do modo vibracional 1624 cm^{-1} foi identificado como uNH (Amida I) (Christersson et al., 2000, Schultz et al., 1996). A vibração de flexão δNH (Amida II) foi identificada em 1550 cm^{-1} (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010). O modo vibracional 1432 cm^{-1} foi atribuído a vibrações de grupos CH_2 e CH_3 (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010). O modo vibracional 1409 cm^{-1} demonstra as vibrações dos grupos $\text{C} = \text{O}$ (éster) e em 1118 cm^{-1} indica γs (PO_2) e anel $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010). O modo vibracional 1073 cm^{-1} corresponde a proteínas glicosiladas e fósforo (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010).

A concentração salivar de cortisol foi determinada em regiões espectrais de $1943\text{-}1526\text{ cm}^{-1}$, $1391\text{-}1249\text{ cm}^{-1}$ e $1115\text{-}973\text{ cm}^{-1}$. As regiões espectrais a $1567\text{-}1526$ e $1488\text{-}1406\text{ cm}^{-1}$ determinam a imunoglobulina A secretória (sIgA). As regiões espectrais a $1578\text{-}144$, $1526\text{-}1496$ e $1444\text{-}1305\text{ cm}^{-1}$ determinam a concentração de alfa-amilase (Khaustova et al., 2010). Cálculo do nível de proteína total analisado nas seguintes regiões espectrais: $1503\text{-}1440\text{ cm}^{-1}$, $1317\text{-}1249\text{ cm}^{-1}$ e $1190\text{-}936\text{ cm}^{-1}$ (Khaustova et al., 2010) (Tabela 2).

Tabela 2: Regiões espectrais e respectivos componentes químicos.

Substância	Pico
Cortisol 1	$1943\text{-}1526$
Cortisol 2	$1391\text{-}1249$
Cortisol 3	$1115\text{-}973$
IgA1	$1567\text{-}1526$
IgA2	$1488\text{-}1406$
Alfa-Amilase 1	$1578\text{-}144$
Alfa-Amilase 2	$1526\text{-}1496$
Alfa-Amilase 3	$1444\text{-}1305$
Proteínas Totais 1	$1503\text{-}1440$
Proteínas Totais 2	$1317\text{-}1249$
Proteínas Totais 3	$1190\text{-}936$

ANÁLISE CURVA ROC

É uma ferramenta utilizada para descrever quantitativamente o desempenho de um teste diagnóstico. A partir da análise da sensibilidade e especificidade do teste de diagnóstico. A sensibilidade é definida como a probabilidade de o teste apresentar um resultado positivo, ou seja, considerar que o indivíduo é portador da doença, e especificidade é a probabilidade do teste em fornecer um resultado negativo, ou seja, de o indivíduo não ser portador da doença. A área sobre a curva (AUC) é uma medida resumo usual do desempenho do teste, e ela é estimada considerando todas as sensibilidade e especificidades apresentadas. Quando a capacidade do teste em diagnosticar for alta mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo do gráfico, e a área da curva seria próxima do valor 1 (Martinez et al., 2003).

IMUNOHISTOQUÍMICA

Para verificar a localização subcelular do cotransportador de glicose/ Na^+ /água SGLT1 em ductos estriados, a glândula submandibular foi removido e fixado em solução de formaldeído 4% tamponado (PBS) 0,1M, por pelo menos 24hrs. Após a fixação, o tecido foi crioprotegido em concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30%) por no mínimo 24 h e, em seguida, incluído em “OCT compound” (Sakura Finetechical Co, Tokyo). Logo após, o tecido glandular foi seccionado (10 μm) em criostato (Leica CM1850) e seus cortes histológicos foram coletados em lâminas gelatinizadas. Após a reidratação (30 min, TA, PBS 0,1 M) foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina a 5% diluída em PBS + Triton por 1h. Os anticorpos anti-SGLT1 (1:100, Chemicon International), foi incubado durante 12 horas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M (3 vezes por 5 min), incubados com Cy5 (1:150, 1h 30min, Alexa Fluor 488), novamente lavados em PBS 0,1 M (2 vezes por 5 min) e, por fim, foi realizada a marcação do citoesqueleto indicando a membrana plasmática (faloidina conjugada à rodamina, 1:200, 1h 30min, Molecular Probes).

Mais uma vez os cortes foram lavados com PBS 0,1 M (3 vezes por 5 min), cobertos por uma lamínula montada com fluoropep, e analisados em microscópio de fluorescência (EVOS FL Imaging System, Thermo Fisher

Scientific). Foram analisados 3 cortes em animais controles, sham e DRC e selecionado um ducto representativo. Os controles negativos (CN) do experimento foram realizados com a omissão dos anticorpos primários. As imagens obtidas foram analisadas e em seguida, colocalizadas com auxílio do programa computacional (Image J 1.50i; National Institutes of Health, USA).

SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A peroxidação lipídica é avaliada pela formação do subproduto malondialdeído (MDA) que reage ao aquecimento com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um produto de coloração róseo que é mensurado em fluorímetro. Para a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as amostras foram incubadas por 2 horas em banho de água fervente (95°C) com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.67%. Após resfriadas em gelo, o complexo róseo foi extraído com butanol e centrifugação. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada utilizando o 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetida ao mesmo tratamento que as amostras. Os níveis de TBARS foram calculados em nmol TBARS/mg de proteína.

CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

Para a quantificação dos níveis de GSH, as proteínas presentes nas amostras foram precipitadas com ácido metafosfórico e em seguida centrifugados a 7000 xg por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi utilizado na análise e incubado por 15 minutos com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8.0 contendo EDTA 5mM e o-ftaldialdeído. A fluorescência foi lida a 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). As concentrações de GSH foram calculadas utilizando uma curva padrão de GSH (0.001-0.1 mM) como nmol/mg de proteína.

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELO MÉTODO DE FRAP

A capacidade antioxidante total foi avaliada por FRAP (Ferric-Reducing Ability) a partir da redução do Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pelo TPTZ (2,4,6-Tris (2-piridil-s-triazina) para formar o complexo $\text{Fe}^{+2}\text{-TPTZ}$, de coloração azul

intensa. Foram adicionadas as amostras ao meio de reação contendo tampão acetato de sódio pH 3.6, TPTZ 10 mM e cloreto férrico 20 mM. A reação foi incubada por 6 min à 37°C e a absorbância foi lida a 593 nm. A capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão de trolox. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$.

CATALASE

A atividade da catalase foi determinada em glândulas submandibulares pelo decaimento de H_2O_2 na região UV. Foi adicionado 10 μL de triton 10 % a 100 μL do homogeneizado, sob agitação. Após 15 minutos de repouso em gelo, 10 μL dessa amostra foi pipetada em poços de microplaca, onde foi adicionado 300 μL de solução de H_2O_2 (0,22% v:v em tampão fosfato de potássio 10 mM). A leitura da microplaca foi realizada imediatamente após adição da solução de H_2O_2 em fluorímetro com leitura em intervalos de 15 segundos por 10 min a 240 nM.

ANALISES ESTATÍSTICAS

Os resultados expressos como média \pm EPM. Foram comparados através de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste Student-Newman-Keuls ou teste T não pareado. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism®, v. 3,02 (GraphPad, USA). Com nível de significância estabelecido de 5% (valor descritivo de $P<0,05$).

RESULTADOS

O peso corporal e o peso do rim remanescente dos animais estão ilustrados na figura 7. Não ocorreu diferença ($P>0,05$) no peso dos animais controles, sham e DRC previamente a simulação de cirurgia ou cirurgia de nefrectomia 5/6, respectivamente (Figura 7, A). Além disso, 6 semanas após o início dos experimentos, o peso corporal manteve-se inalterado ($P>0,05$) entre animais controles, sham e DRC (Figura 7, B). Como esperado, o peso do rim remanescente foi aumentado 43% e 47% ($P<0,05$) em ratos DRC quando comparados com controle e sham, respectivamente (Figura 7, C).

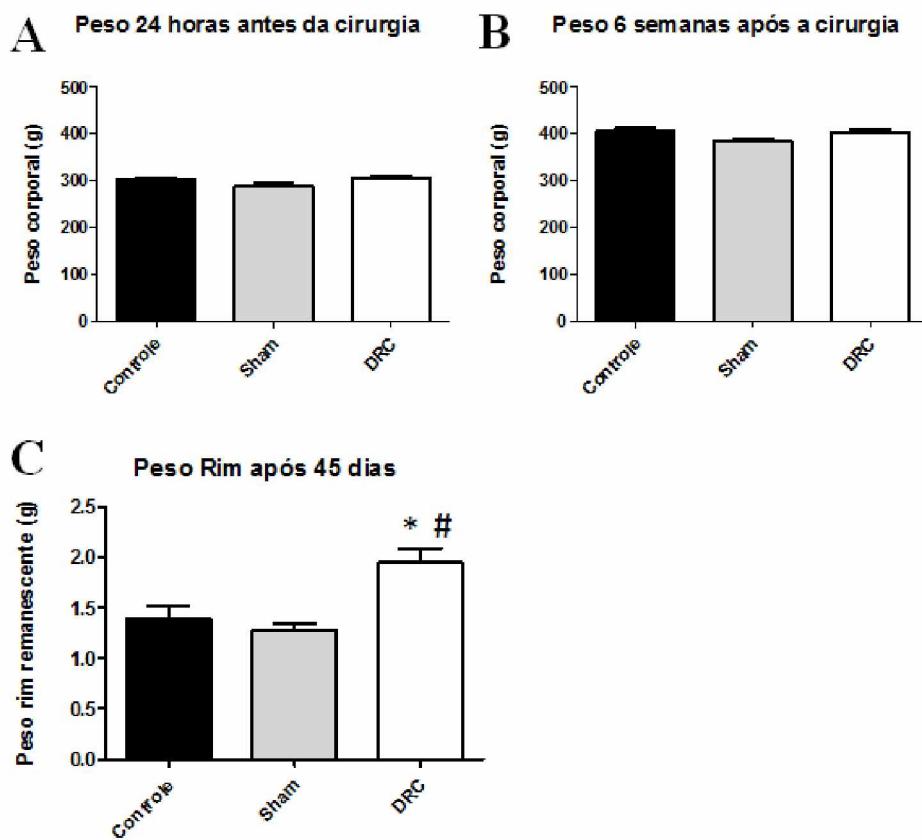


Figura 7: Peso corporal e Peso do Rim Remanescente. A- Peso dos animais 24 horas antes da cirurgia ou simulação. B- Peso dos animais 6 semanas após a cirurgia ou simulação. C- Peso do rim remanescente 6 semanas após a cirurgia ou simulação em animais controle, sham e doença renal crônica (DRC). Os valores são expressos em média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P<0,05$ vs Controle; # $P<0,05$ vs Sham.

A ingestão de água e o volume de urina foram semelhantes nos ratos controle, sham e DRC antes da simulação de nefrectomia ou nefrectomia 5/6. Duas semanas após a cirurgia a ingestão de água e volume de urina permaneceram semelhantes entre animais controle, sham e DRC ($P>0,05$) (Figura 8A, 8B, 8C e 8D). A ingestão de água 4 semanas após a cirurgia foi semelhante em animais controles, sham e DRC (Figura 8E). No entanto, o volume de urina em animais DRC após 4 semanas foi aumentado 27% e 37% ($P<0,05$) quando comparado com controles e sham, respectivamente ($P<0,05$) (Figura 8F). Após 6 semanas, a ingestão de água aumentou 28% e 48% ($P<0,05$) em animais DRC quando comparados com animais controles e sham, respectivamente. De forma paralela, o volume de urina 6 semanas após a nefrectomia 5/6 foi aumentado 75% e 91% ($P<0,05$) em comparação com controle e sham, respectivamente (Figura 8G e 8H).

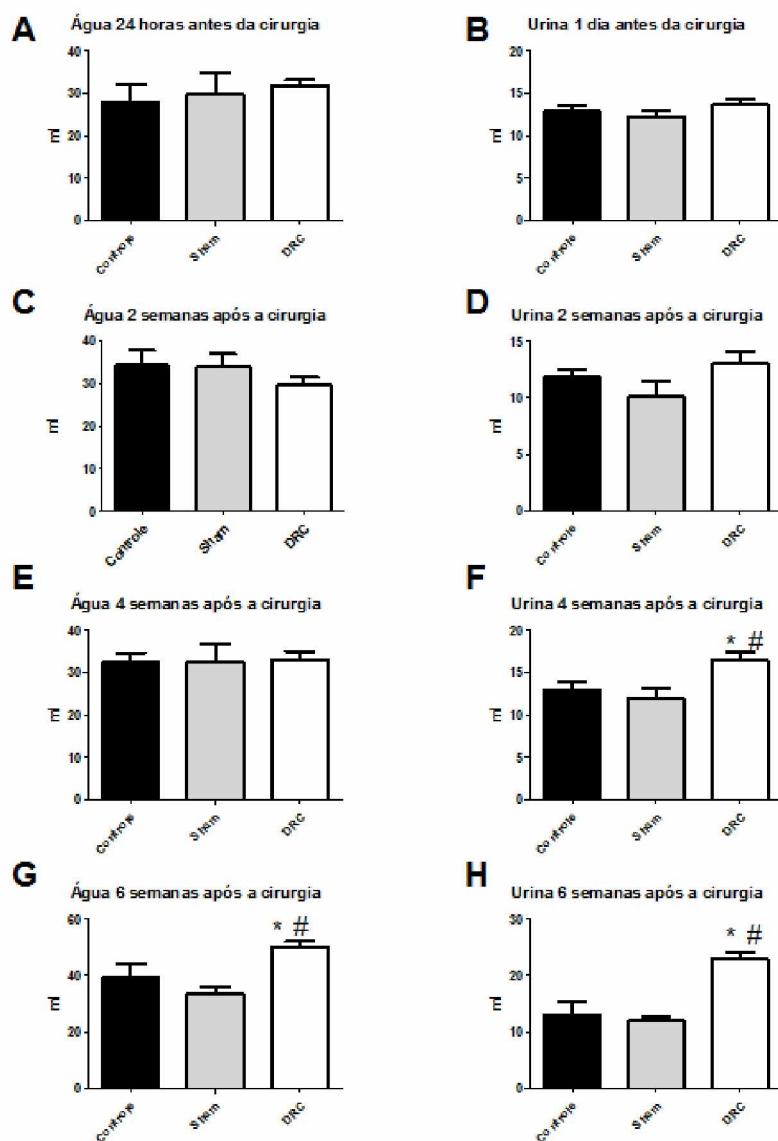


Figura 8: Consumo de água e Volume de Urina. A- Consumo de água durante 24h previamente a cirurgia ou simulação. B- Volume urinário durante 24h previamente a cirurgia ou simulação. C- Consumo de água diário 2 semanas após a cirurgia ou simulação. D- Volume urinário diário 2 semanas após a cirurgia ou simulação. E- Consumo de água diário 4 semanas após a cirurgia ou simulação. F- Volume urinário diário 4 semanas após a cirurgia ou simulação. G- Consumo de água diário 6 semanas após a cirurgia ou simulação. H- Volume urinário diário 6 semanas após a cirurgia ou simulação em animais controles, sham e doença renal crônica (DRC). Os valores são expressos em média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * P<0,05 vs Controle; # P<0,05 vs Sham.

A concentração de creatinina urinária foi reduzida 52% e 45% ($P<0,05$) em animais DRC em comparação com controles e sham, respectivamente. Além disso, a concentração da creatinina urinária em animais controles e sham foram semelhantes ($P>0,05$) (Figura 9A). Como esperado, a concentração de creatinina sérica foi aumentada 31% e 22% ($P<0,05$) em animais DRC em comparação com controles e sham. A concentração da creatinina sérica em animais controles e sham também foram semelhantes ($P>0,05$) (Figura 9B).

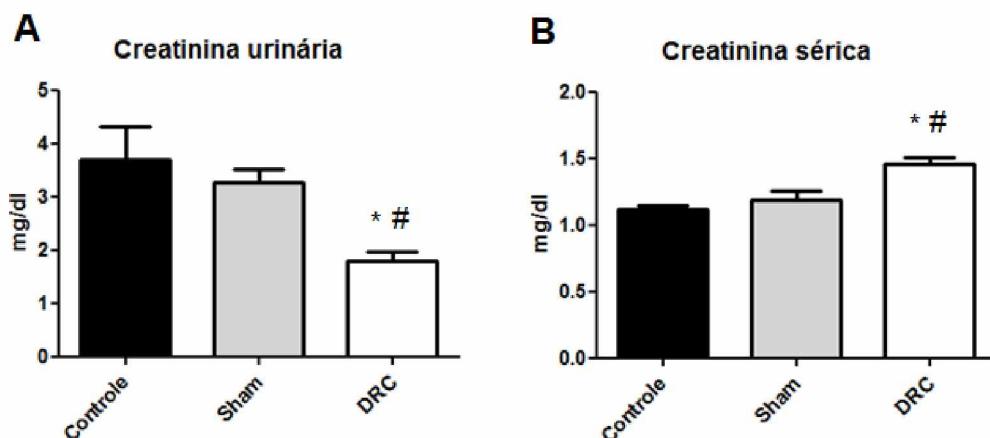


Figura 8: Concentração de creatinina urinária e sérica. A- Creatinina urinária coletadas nas 24 horas anteriores do momento da coleta de tecidos realizado 6 semanas após a cirurgia ou simulação. B- Creatinina sérica após 6 semanas de nefrectomia 5/6 ou simulação em animais controle, sham e doença renal crônica (DRC). Os valores são expressos em média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P<0,05$ vs Controle; # $P<0,05$ vs Sham.

Ao analisarmos o peso das glândulas salivares parótida (Figura 9A), submandibular (Figura 9B) e sublingual (Figura 9C) verificamos que não ocorreu alteração ($P>0,05$) entre os animais controle, sham e DRC.

No entanto, a razão entre o fluxo salivar estimulado dividido pelo peso glandular (soma do peso da parótida, da submandibular e da sublingual) e o fluxo salivar estimulado permaneceram inalterados ($p> 0,05$) (Figura 9D e 9E). O fluxo salivar não estimulado foi reduzido 51% e 53% ($P<0,05$) nos animais DRC em relação aos animais de controles e sham, respectivamente (Figura 9F).

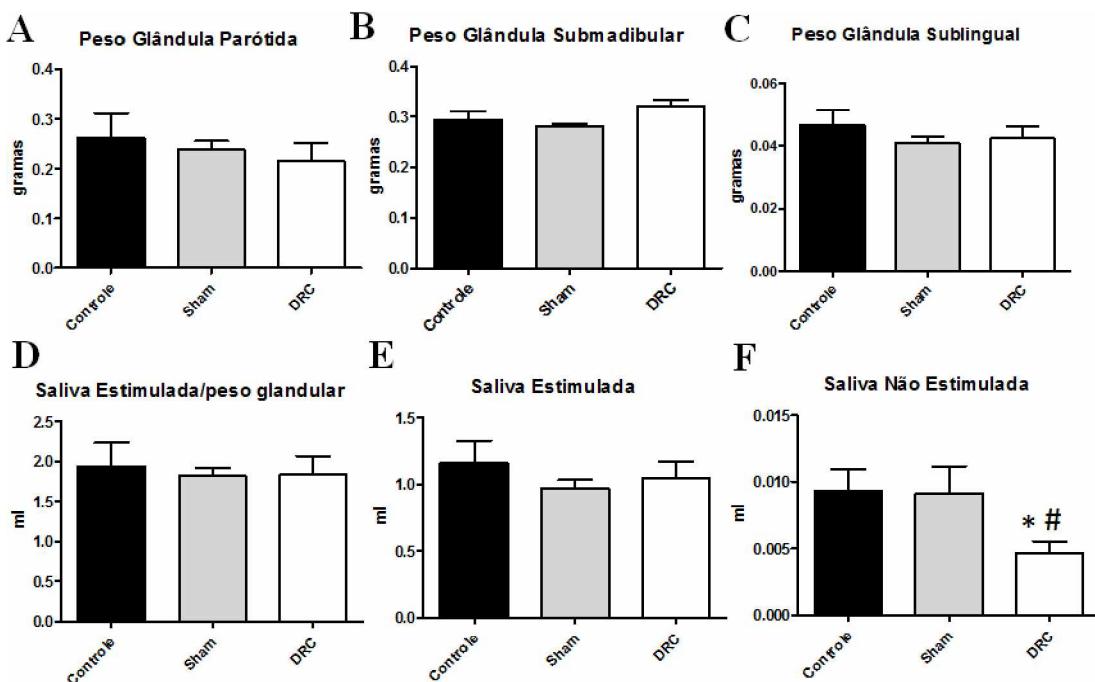


Figura 9: Peso das glândulas salivares e mensuração do fluxo salivar. A- Peso da glândula parótida. B- Peso da glândula submandibular. C- Peso da glândula sublingual. D- Razão da saliva estimulada pelo peso glandular de parótida, submandibular e sublingual. E- Saliva estimulada. F- Saliva não-estimulada em animais controles, sham e doença renal crônica (DRC). Os valores são expressos em média \pm EPM. Teste T Student não pareado. *P<0,05 vs Controle; # P<0,05 vs Sham.

Buscando justificar a redução da secreção de saliva não-estimulada em animais DRC, foi realizada a imunofluorescência para marcação subcelular do cotransportador de Na⁺/glicose/água SGLT1. A análise em células ductais de glândula submandibular de ratos controles, Sham e DRC revelou ausência de marcação em membrana luminal de glândulas submandibulares em animais controles, sham e DRC (Figura 10 A-I).

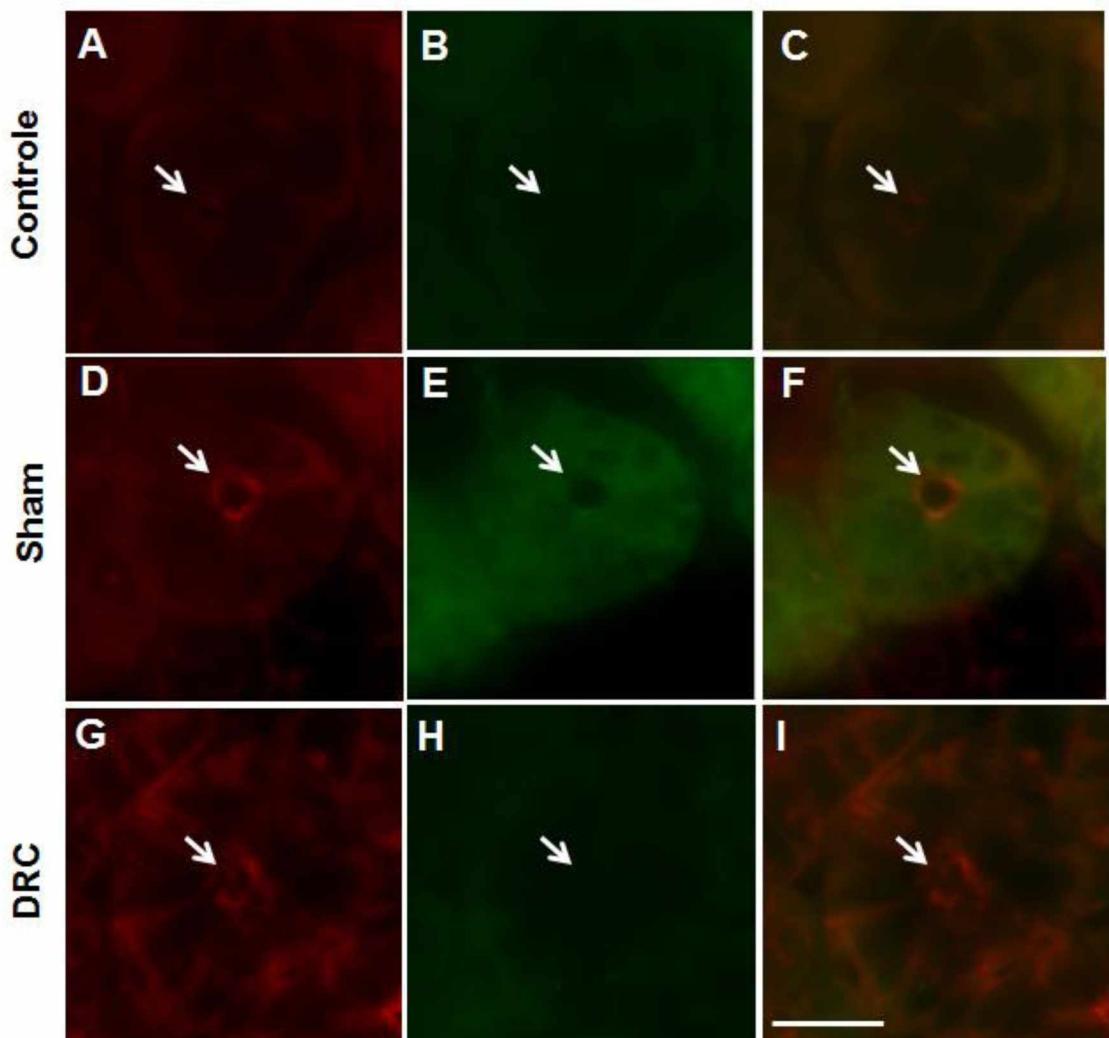


Figura 10: SGLT1 em células de ducto estriado de ratos controles (A-C), sham (D-F) e DRC (G-I). A marcação de membrana plasmática, na cor vermelha, com faloidina-rodamina está representada na primeira coluna (A, D e G). A marcação do SGLT1, na cor verde está representada na segunda coluna (B, E e H) e a sobreposição das mesmas fotomicrografias, para colocalização da proteína SGLT1, na terceira coluna (C, F e I). A seta indica a membrana luminal da célula ductal. Barra: 25 μ m.

A figura 11 demonstra a regulação de um marcador de estresse oxidativo (TBARS) e a atividade de enzimas do sistema anti-oxidante em glândulas submandibulares de animais controles, sham e DRC. A peroxidação lipídica (TBARS) aumentou nos animais DRC em comparação com os animais controle e sham ($P<0,05$). Além disso, não ocorreu diferença significativa ($P>0,05$) na

TBARS de glândula submandibular entre animais controles e sham (Figura 11A). A atividade da catalase foi similar ($P>0,05$) em animais controle, sham e DRC (Figura 11B). A atividade de FRAP foi reduzida ($P<0,05$) em animais sham em comparação com controles. Foi demonstrado ainda aumento ($P<0,05$) da atividade de FRAP em animais DRC em comparação com animais sham (Figura 11C). E aumento ($P<0,05$) da atividade de glutationa peroxidase (GSH) em glândulas submandibulares de animais DRC em comparação com controles e sham. Além disso, não ocorreu diferença ($P>0,05$) entre animais controles e sham (Figura 11D).

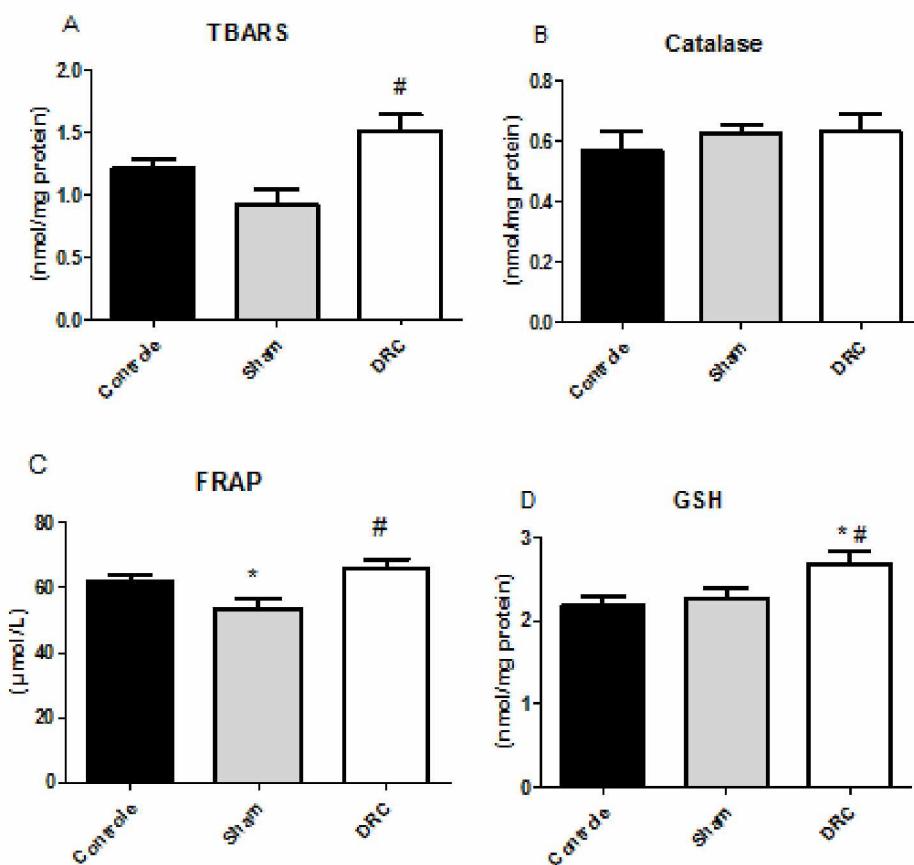


Figura 11: Gráfico de análise de biomarcadores do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes na glândula submandibular de ratos controle, sham e DRC. A – Atividade de peroxidação lipídica (TBARS). B – Atividade da catalase. C - Capacidade antioxidante total. D – Atividade da glutationa peroxidase (GSH). Os valores são expressos em média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P<0,05$ vs Control; # $P<0,05$ vs Sham.

O espectro infravermelho de saliva estimulada por pilocarpina é uma superposição de vários compostos e as intensidades das bandas de absorção neste espectro de FTIR são diretamente proporcionais à concentração destes componentes. Os espectros FTIR da saliva de ratos controles, sham e DRC estão representados na figura 12. Foram identificados 6 picos comuns nos três grupos estudados com os seguintes comprimentos de onda de: 3332 cm^{-1} identificado como terminações NH e OH, 2935 cm^{-1} identificado como CH, 1624 cm^{-1} identificado como Amida I (uNH), 1550 cm^{-1} identificado como Amida II (δNH), 1432 cm^{-1} identificado como vibrações de grupos CH₂ e CH₃, 1409 cm^{-1} identificado como vibrações dos grupos C = O (éster), 1118 cm^{-1} identificado como $\gamma\text{s(PO}_2)$ e anel C-O-C e 1073 cm^{-1} identificado como $\gamma\text{s(PO}_2)$ e anel C-O-C proteínas glicosiladas e fósforo (Figura 12).

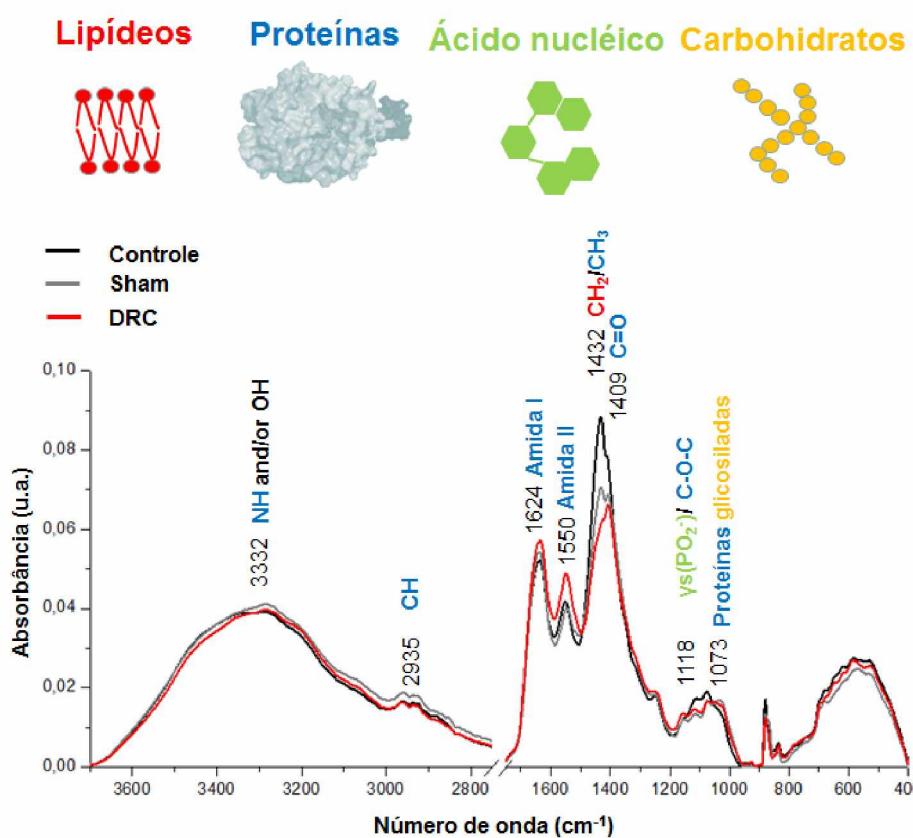


Figura 12: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em saliva de animais controle, sham e doença renal crônica (DRC).

Buscando indicar modos vibracionais com potencial para diferenciar a DRC na saliva, a figura 13 indica os valores de *fold change* (*indicando quantas vezes a absorbância está mais ou menos intensa em determinada situação comparada a outra*) do espectro de FTIR da saliva de animais controles (Figura 13 A) e sham (Figura 13 B) em relação aos animais DRC. Destacam-se as alterações de *fold change* relativas aos modos vibracionais 1776 cm^{-1} , 948 cm^{-1} , 911 cm^{-1} e 884 cm^{-1} com *fold change* maior que $0,5$ ($>0,5$); 860 cm^{-1} com *fold change* maior que 1 (>1) e 964 cm^{-1} que apresentou *fold change* maior que $1,5$ ($>1,5$) em ambas comparações.

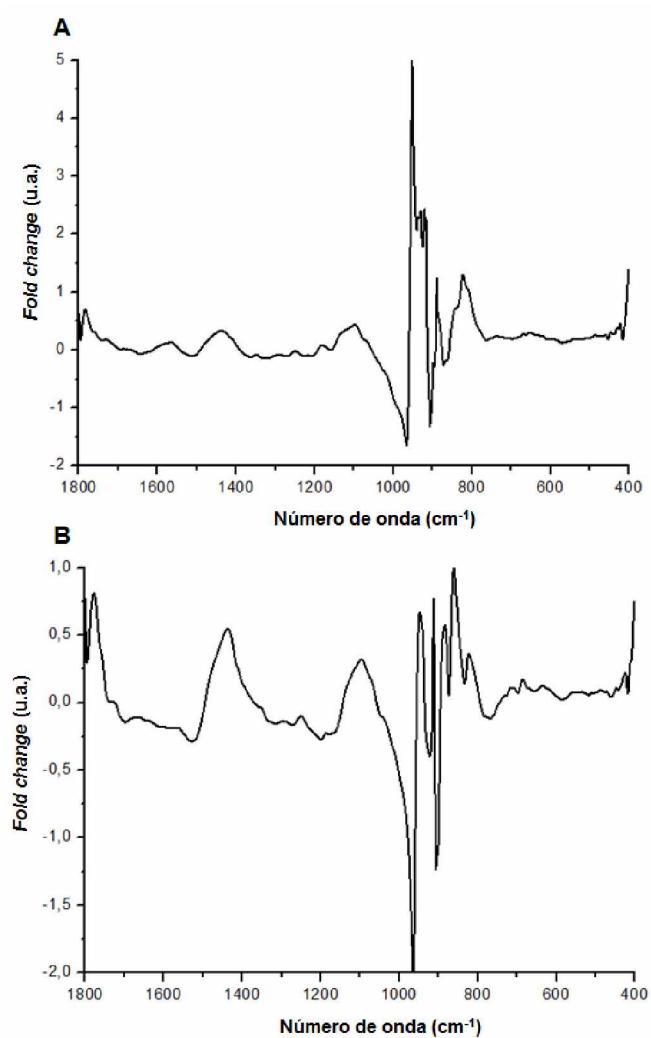


Figura 13: Alterações de *fold change* relativas aos modos vibracionais do espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em saliva de animais controle (A) e sham (B) em comparação com doença renal crônica (DRC).

Buscando diferenciar os modos vibracionais $\sim 1432 \text{ cm}^{-1}$ e $\sim 1409 \text{ cm}^{-1}$, a figura 14 demonstra o pré-processamento com a primeira derivada Savitzky-Golay em parte do espectro (1450 cm^{-1} até 1350 cm^{-1}) de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em saliva de animais controle, sham e doença renal crônica (DRC). Após este pré-processamento fica evidente a redução do modo vibracional $\sim 1432 \text{ cm}^{-1}$ na saliva de animais DRC em comparação com controles e sham.

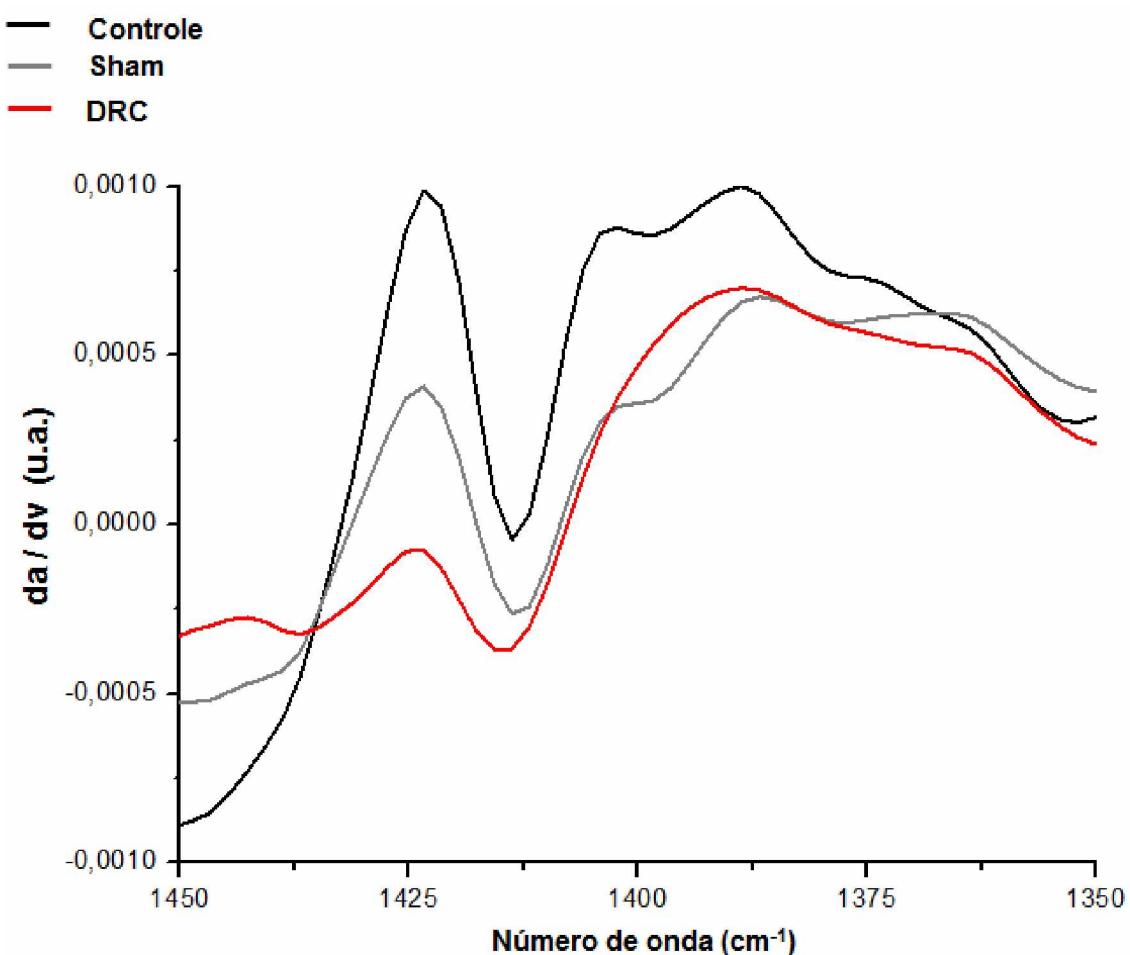


Figura 14: Pré-processamento com primeira derivada Savitzky-Golay do espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em saliva de animais controle, sham e doença renal crônica (DRC).

A concentração de cortisol salivar foi aumentada ($P < 0,05$) em ratos DRC em comparação com ratos controles e sham. As concentrações de cortisol

salivar nos ratos controles e sham não foram alteradas ($P>0,05$) (Figura 15A). A imunoglobulina A (IgA) foi reduzida ($P<0,05$) em ratos DRC em comparação com ratos controles e sham. Como esperado, a IgA salivar de ratos controles e sham não foi alterada (Figura 15B). As concentrações da amilase e as proteínas totais na saliva de ratos controle, sham e DRC foram similares ($P>0,05$) (Figura 15C e Figura 15D) respectivamente.

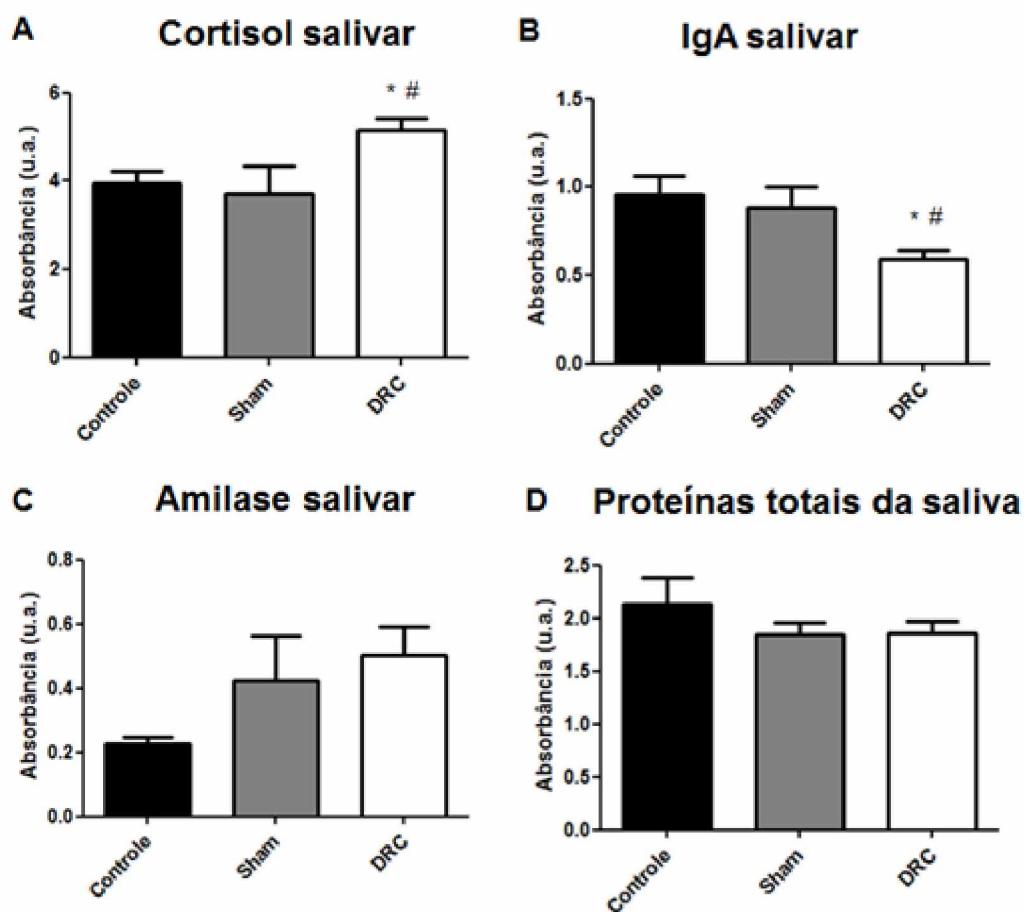
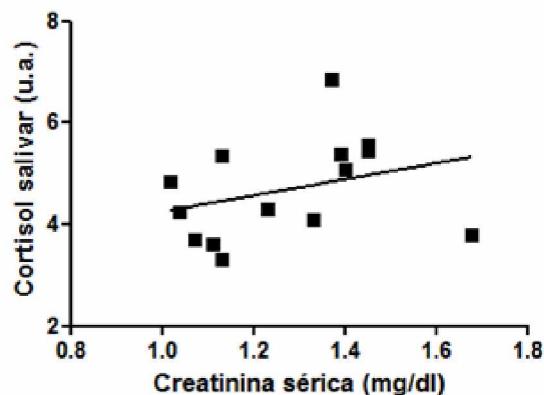


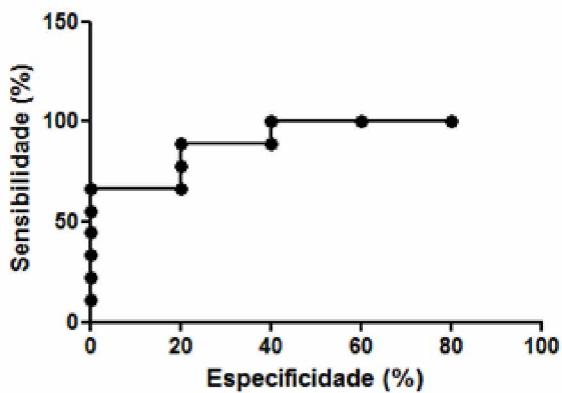
Figura 15: Absorbâncias obtidas em FTIR. A- Concentração de cortisol, IgA, amilase e proteínas totais da saliva em animais controles, sham e DRC mensuradas por FTIR. B- Concentração de cortisol na saliva. C- Concentração IgA na saliva. D- Concentração amilase salivar. E- Concentração proteínas totais na saliva de animais controle, sham e doença renal crônica (DRC). Os valores são expressos em média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls / Teste T Student não-pareado. * $P<0,05$ vs Controle; # $P<0,05$ vs Sham.

Para demonstrar o potencial diagnóstico da análise salivar do cortisol por espectroscopia FTIR foram analisadas a saliva de ratos de controles, sham e DRC. A correlação de Pearson entre a creatinina sérica e o cortisol salivar não foi significativa (R^2 de 0,3159, $P < 0,05$) (Figura 16A). No entanto, os resultados demonstraram que o cortisol salivar teve área sob a curva (AUC) de 0,911 (ROC = 0,911, $P < 0,05$), com uma sensibilidade de 88,9% e especificidade de 80% em comparação com controle (Figura 16B). Em paralelo, os resultados demonstraram que o cortisol salivar teve AUC de 0,8519 (ROC = 0,8519, $P < 0,05$), com uma sensibilidade de 88,89% e especificidade de 83,33% em comparação com controle (Figura 16C).

A Correlação de creatinina sérica e cortisol salivar



B Curva ROC cortisol: DRC vs Controle



C Curva ROC cortisol: DRC vs sham

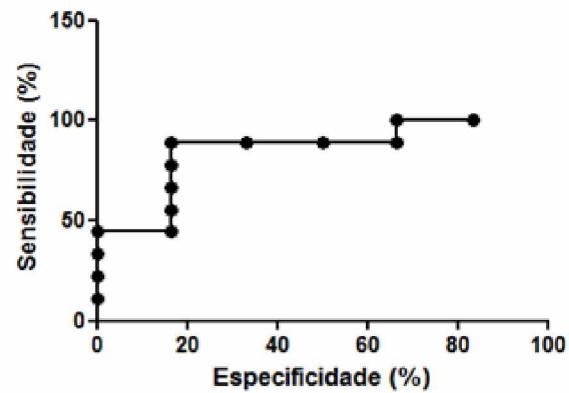
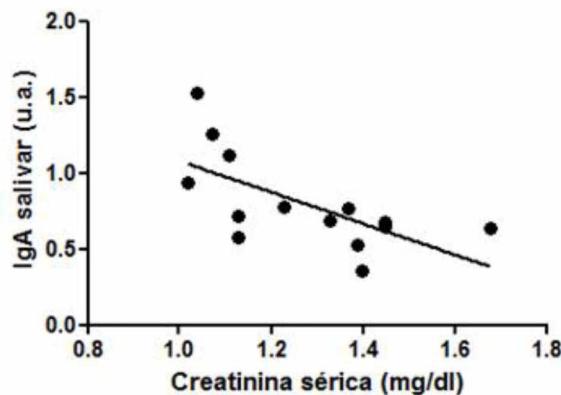


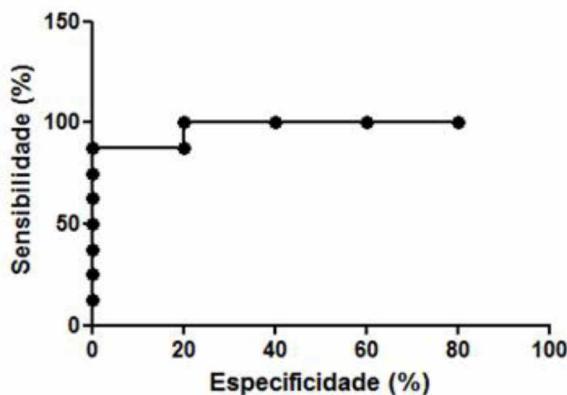
Figura 16: Correlação de Pearson entre cortisol salivar e creatinina sérica e Curva de ROC para diagnóstico de DRC por meio de cortisol salivar de animais controles, sham e DRC. A- Correlação de Pearson entre a concentração de cortisol salivar e creatinina sérica. B- Curva ROC do cortisol salivar entre animais Controle e DRC. C- Curva ROC do cortisol salivar entre animais sham e DRC.

A figura (Figura 17A) demonstra que ocorreu uma correlação de Pearson negativa entre concentração da IgA salivar com a concentração de creatinina sérica (R^2 de -0,6489, $P<0,05$). A análise de Curva ROC para avaliar o potencial deste biomarcador em testes diagnósticos apresentou valores de AUC de 0,975 (ROC = 0,975, $P<0,05$), com sensibilidade de 87,5% e especificidade de 100% em comparação com animais controles (Figura 17B). A análise de Curva ROC para avaliar o potencial do biomarcador em testes diagnósticos apresentou valores de AUC de 0,8750 (ROC = 0,8750, $P<0,05$), com sensibilidade de 87,5% e especificidade de 85,71% em comparação com animais sham (Figura 17C).

A Correlação de creatinina sérica e IgA salivar



B Curva ROC IgA: DRC vs controle



C Curva ROC IgA: DRC vs sham

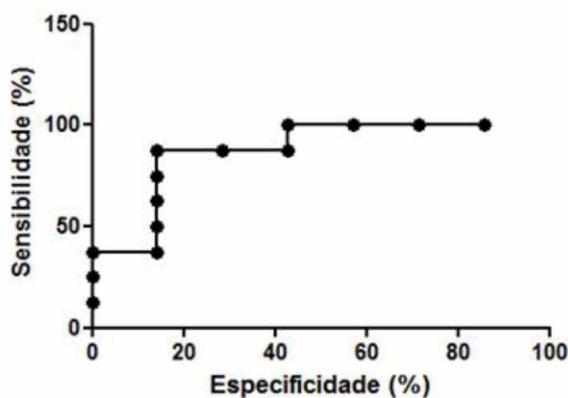


Figura 17: Correlação de Pearson entre IgA salivar e creatinina sérica e Curva de ROC para diagnóstico de DRC por meio de IgA salivar de animais controles, sham e DRC. A- Correlação de Pearson entre a concentração de IgA salivar e creatinina sérica. B- Curva ROC do IgA salivar entre animais Controle e DRC. C- Curva ROC do IgA salivar entre animais sham e DRC.

DISCUSSÃO

É amplamente aceito que a DRC está associada a mudanças na saúde bucal. O presente estudo analisa, pela primeira vez, o impacto da DRC no fluxo salivar não estimulado e a caracterização da saliva estimulada por pilocarpina pela espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no modelo experimental de nefrectomia 5/6. Demonstramos evidência de redução do fluxo salivar não estimulado e manutenção do fluxo salivar estimulado pela pilocarpina na DRC em comparação com ratos não-DRC. Além disso, a DRC aumentou a concentração salivar de cortisol e diminuiu os níveis de IgA medidos por espectroscopia FTIR. Observou-se também uma boa precisão com alta sensibilidade e especificidade na análise da curva ROC de cortisol salivar e IgA salivar para diagnóstico de DRC..

Aparentemente, a ingestão de água e as alterações do volume da urina não foram alteradas até 2 semanas após a nefrectomia 5/6. No período entre a segunda e quarta semanas, os ratos DRC apresentaram aumento no volume de urina com manutenção do consumo hídrico. Além disso, os ratos com DRC mantiveram níveis elevados de volume de urina e exibiram aumento na ingestão de água dentro de 4 a 6 semanas. Foi relatado que o volume de urina e a ingestão de água estão aumentados em camundongos 2 semanas após nefrectomia 5/6 (Gava et al., 2012).. Considerando que os ratos do presente trabalho apresentaram alterações do volume urinário e consumo hídrico de forma mais tardia, acreditamos que estas divergências ocorreram por níveis menos severos de comprometimento renal ou por divergência do efeito da DRC em ratos e camundongos. Corroborando este trabalho, também foi evidenciado aumento do peso do rim remanescente na nefropatia induzida por nefrectomia 5/6. Este aumento do peso do rim remanescente ocorre devido ao aumento da microcirculação dos glomérulos renais remanescentes associado com aumento do volume de filtração (Ellis et al., 1977; Tapia, 1999; Gava et al., 2012). Os animais DRC demonstraram os mesmos perfis metabólicos e urinários descritos em estudos anteriores, nos quais a ingestão de água, o volume de urina e o peso renal aumentaram em DRC após 4 semanas sem alteração do peso corporal (Li

et al., 2012, Gámez-Méndes et al., 2014, Szabo et al., 2008, Veiga et al., 2016). Em conjunto estes dados indicam a presença de doença renal crônica. É aceito que o período experimental de 8 semanas como um estádio moderado de DRC (redução de ~ 50% na função renal) (Bergamaschi et al., 1997).

Nossos dados corroboram com outros trabalhos que indicaram aumento da concentração de creatinina sérica (Bergamaschi et al., 1997; Romero et al., 1999; Tsuruoka et al., 2002; Ienaga & Yokozawa, 2010), o que está correlacionado com a redução da concentração de creatinina urinária, proteinúria e redução da presença de glomérulos renais (Gava et al., 2012). Em conjunto os dados indicam que o modelo de nefrectomia 5/6 promoveu o desenvolvimento de uremia e aumento da concentração de creatinina plasmática, o que confirma a instalação da doença renal crônica. Comparando a severidade das alterações do presente trabalho com a literatura, os dados indicam a instalação da DRC em estágio moderado. Esta severidade da DRC está associada ao tempo (6 semanas) após a nefrectomia 5/6.

A detecção precoce da DRC desempenha um papel crucial para reduzir a gravidade e possíveis complicações do processo da doença, desta forma o período experimental de 6 semanas foi escolhido para estudar os parâmetros salivares em estágios iniciais e moderados da DRC.

Aparentemente, os pesos da parótida, submandibular e sublingual permaneceram semelhantes nos ratos controles, sham e DRC. Não encontramos outros estudos que mostraram peso da glândula salivar em modelos DRC. No entanto, os possíveis efeitos da DRC no peso da glândula salivar após uma exposição mais prolongada aos danos sistêmicos produzidos pela DRC precisam ainda ser cuidadosamente investigados. Além disso, a manutenção do fluxo salivar estimulado pela pilocarpina indica que a ativação da via intracelular do receptor muscarínico-fosfolipase C-IP3-Ca++ não está alterada pelos efeitos diretos ou indiretos da DRC. Isto corrobora outro trabalho que demonstrou manutenção do fluxo salivar estimulado com pilocarpina mesmo em períodos mais prolongados de indução da DRC (8 e 12 semanas após a nefrectomia 5/6; Romero et al., 2016). Além disso, o fluxo salivar estimulado pelo

agonista β -adrenérgico foi reduzido apenas no estágio mais avançado da DRC com 12 semanas e não ocorreu com 8 semanas (Romero et al., 2016).

Pelo nosso conhecimento, esta é a primeira vez que foi descrito diminuição no fluxo salivar não estimulado em ratos portadores de DRC. Considerando que a via parassimpática de estímulo da secreção salivar não foi alterada mesmo em estágios avançados da DRC, acreditamos que a redução da secreção salivar não estimulada ocorreu devido a alterações na via intracelular simpática mediada por receptores α -adrenérgicos. Outros estudos em seres humanos também demonstraram que o fluxo salivar não estimulado estava comprometido em pacientes com doença renal submetidos à hemodiálise (Kho et al., 1999; Bayraktar et al., 2004).

Buscando avaliar o mecanismo fisiológico que promove a redução da secreção salivar, avaliamos a presença do cotransportador de glicose/ Na^+ /Água SGLT1 na membrana luminal de células ductais. No entanto, diferentemente do que ocorreu em animais diabéticos e hipertensos, a redução do fluxo salivar não-estimulado não pode ser relacionada com a presença deste cotransportador na membrana luminal de células ductais (Sabino-Silva et al., 2009; Sabino-Silva et al., 2013). Considerando que a análise nos animais DRC ocorreu após o estímulo parassimpático, acreditamos que novas análises em condições de ausência de conhecidos estímulos salivatórios seja a ideal. Considerando que a atividade simpática promove aumento da translocação do SGLT1 ductal (Sabino-Silva et al., 2013), acreditamos que não ocorre aumento da atividade simpática dirigida para as glândulas salivares nos animais DRC após 6 semanas de nefrectomia 5/6.

Adicionalmente, foi demonstrado aumento do estresse oxidativo evidenciado pelo aumento de TBARS na glândula submandibular de ratos DRC. Considerando os potenciais efeitos deletérios do estresse oxidativo em tecidos glandulares, espera-se que a manutenção desta condição possa promover danos ao processo de secreção salivar (volume e/ou composição). Aparentemente, nesta patologia a GSH é a primeira enzima antioxidante que procura reverter o estresse oxidativo na glândula submandibular, visto que esta enzima aumenta sua atividade enquanto que a catalase permanece inalterada.

Considerando que existe um aumento da capacidade antioxidante total (FRAP) e um aumento da GSH, percebe-se que o aumento do estresse oxidativo ocorre provavelmente por uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio diretamente na glândula submandibular e não por um dano do sistema antioxidante. No entanto, sabe-se que o aumento das espécies reativas de oxigênio pode ter migrado de outros territórios para glândula submandibular por meio da irrigação sanguínea.

Devido ao baixo volume de saliva não estimulada, avaliamos o perfil salivar na DRC somente na saliva estimulada pela via parassimpática. A análise de espectroscopia FTIR demonstrou um perfil de espectroscopia semelhante a outros trabalhos que avaliaram a saliva por esta técnica (Khaustova et al., 2010; Mikkonen et al., 2016; Júnior et al., 2015). Não identificamos estudos avaliando a saliva em pacientes ou animais experimentais com DRC. Não identificamos nenhum modo vibracional especificamente na saliva de animais com DRC, o que certamente possibilitaria um diagnóstico salivar de DRC ainda mais preciso. No entanto, uma análise ainda mais detalhada por meio de deconvoluções e derivadas de Savitzky-Golay realizadas em todo o espectro salivar identificamos componentes específicos na saliva em condições de DRC.

A análise qualitativa demonstra um aumento do perfil médio do modo vibracional 1550 cm^{-1} que indica a presença de amida II e uma redução dos modos vibracionais em 1432 cm^{-1} e 1409 cm^{-1} que indicam a presença de CH_2/CH_3 e carbonila. A carbonila é um grupo funcional constituído de um átomo de carbono e um de oxigênio, ligados por ligação dupla. O aumento de modos vibracionais específicos de proteínas e a redução de outros modos vibracionais também relacionados com proteínas é um forte indicativo de que algumas proteínas apresentam aumento de concentração e outras uma diminuição na saliva em portadores de DRC. Desta maneira, percebe-se a necessidade análises de proteínas específicas na saliva de pacientes com DRC para relacionar com as alterações orais frequentes nesta população.

Além disso, a redução do modo vibracional 1432 cm^{-1} , que é associado ao grupamento CH_2 presente no colesterol (Huagn et al., 2011), pode indicar possíveis alterações na presença de lipídeos e colesterol na saliva. .

Baseado no elegante trabalho de Khaustova e colaboradores, avaliamos a presença de cortisol, IgA, amilase e proteínas totais na saliva. Recentemente, o nível de cortisol sérico e o cortisol salivar foram negativamente correlacionados com a taxa de filtração glomerular (TFG) (Li et al., 2016; PMID: 26800302). Foi também sugerido que o cortisol poderia alterar a função renal diretamente por seus efeitos na função glomerular e tubular. Os efeitos hormonais agudos do cortisol aumentaram a TFG, enquanto os efeitos a longo prazo dos níveis mais elevados de cortisol podem diminuir a TFG (Li et al., 2016; Smets et al., 2010). Sabe-se que o cortisol salivar pode ser encontrado na forma livre e sua concentração correlaciona com o sangue (Khaustova et al., 2010). De acordo com isso, em ratos DRC, o aumento do cortisol sanguíneo pode estar associado com concentração mais elevada de cortisol salivar. Recentemente, foi descrito que em pacientes com DRC os níveis de cortisol salivar e sanguíneo também se correlacionam (Raff & Trivedi, 2012). Foi sugerido que pacientes com DRC apresentam uma sensibilidade reduzida do *feedback* negativo produzido por dexametasona (Raff & Trivedi, 2012), o que contribui para o aumento de cortisol plasmático dependente de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Acreditamos que a análise do cortisol salivar por meio de FTIR apresenta grande potencial para diagnóstico de Síndrome de Cushing. Considerando o grande estigma da presença desta síndrome em pacientes com DRC (Raff & Trivedi, 2012), a análise de cortisol salivar por meio de espectroscopia FTIR apresenta aplicabilidade reconhecida.

A IgA salivar tem sido descrita como proteína fundamental na primeira linha de defesa do organismo contra patógenos na cavidade oral (Khaustova et al., 2010). A secreção salivar de IgA responde mais intensamente em níveis de alta frequência de estimulação simpática dirigida para as glândulas salivares (Carpenter et al., 2000). Em humanos, não foi encontrado alteração no nível de IgA salivar entre pacientes com DRC em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, durante a hemodiálise, a concentração da IgA foi aumentada (Pallos et al., 2015). A redução dos níveis de IgA salivar em ratos DRC, pode indicar uma alteração da atividade simpática ou diretamente nas glândulas salivares durante a secreção desta proteína.

Já foi demonstrado em estudos clínicos e experimentais uma correlação da concentração de uréia no sangue e na saliva (Mash et al., 1965; Akai et al., 1983; Shannon et al., 2002; Lasisi et al., 2016; Romero et al., 2016). Além disso, sabe-se que a gravidade da doença renal está correlacionada a concentração de ureia na saliva (Tomas et al., 2008). Também foi demonstrado que os níveis de creatinina salivar podem ser determinados para monitorar a DRC nos estádios 4 e 5 (Lasisi et al., 2016). No presente estudo foi observado que as análises salivares do cortisol e da IgA podem ser utilizadas para complementar plataformas diagnósticas com intuito de substituir ou reduzir o a utilização do sangue e urina.

A nefropatia induzida por IgA é uma doença muito prevalente em todo o mundo e uma importante causa da doença renal crônica (Wyatt et al., 2013), e já foi observado o depósito de IgA na região mesangial do rim (Wang et al., 2013). Alguns dados apontaram que pacientes podem apresentar uma remissão de alguns achados clínicos (concentração de creatinina sérica), no entanto, a biópsia quando repetida geralmente indica a presença de IgA glomerular (Hotta et al., 2002). Considerando que as glândulas salivares são um dos territórios com maior secreção de IgA, estudos adicionais poderão indicar que ocorre secreção da IgA salivar direcionada para o líquido extracelular (membrana basolateral) ao invés do direcionamento fisiológico para o lúmen acinar (membrana luminal). Acreditamos que parte da IgA presente no território renal na condição de DRC, pode ter sido secretada pelas glândulas salivares. Em outros territórios já foi descrito um acoplamento de amilase com IgA que poderiam formar complexos protéicos com direcionamento intracelular alterado.

Para que a análise salivar possa ser utilizada como importante valor diagnóstico tem-se a necessidade de comparar futuramente os diagnósticos salivares com os métodos de diagnóstico padrão disponível atualmente. Considerando que a sensibilidade e a especificidade são as características básicas para determinar a exatidão do teste diagnóstico, a análise da curva ROC é utilizada para determinar o potencial de diagnóstico da saliva (Peng et al., 2013). A curva ROC avalia a sensibilidade que é a probabilidade de um método diagnóstico produzir um resultado positivo quando o indivíduo é portador da

doença; e a especificidade que é a probabilidade do método produzir um resultado negativo quando o indivíduo não é portador da doença. (Martinez et al., 2003).

Um estudo anterior demonstrou sensibilidade de 97% e especificidade de 86% utilizando a creatinina salivar para monitorar a DRC nos estádios 4 e 5 (Lasisi et al., 2016). No presente estudo a análise salivar do cortisol e do IgA utilizando a espectroscopia FTIR apresentaram valores altos de sensibilidade e especificidade, especialmente quando se considera a utilização de uma técnica com utilização de recursos financeiros muito baixa. A sensibilidade do cortisol salivar foi de 88,8% e especificidade 80%, enquanto que para a IgA salivar a sensibilidade foi de 87,5% e a especificidade de 100%.

CONCLUSÃO

- ✓ Em conjunto, nossos resultados demonstraram que animais portadores de DRC apresentam níveis normais de secreção salivar estimulada por pilocarpina e fluxo de saliva não estimulada diminuído 6 semanas após a nefrectomia 5/6. Além disso, mostramos um aumento da concentração de cortisol salivar e a redução de IgA salivar avaliados por meio de espectroscopia FTIR. Adicionalmente, evidenciamos por meio de análises de correlação com a creatinina plasmática e dos valores de sensibilidade e especificidade que o cortisol salivar e a IgA mensurados por espectroscopia FTIR apresentam grande potencial como biomarcadores para a doença renal crônica.

REFERÊNCIAS

1. Agarwal R. Blood pressure components and the risk for end-stage renal disease and death in chronic kidney disease. **Clin J Am Soc Nephrol.** 2009 Apr;4(4):830-7.
2. Ahmed S, Raja R, Raghuvanshi SS. Studies On The Spectral Lines of Salivary Samples Taken From Smokers And Non-Smokers. **The Int. J. of Health.** 2009;10(2)1-5.
3. Akai T, Naka K, Yoshikawa C, Okuda K, Okamoto T, Yamagami S, et al. Saliva urea nitrogen as an index to renal function: a test-strip method. **Clin Chem.** 1983;29(10):1825–7.
4. Barbieri LG. **Qualidade de vida dos pacientes com Insuficiência renal crônica submetido ao Tratamento de hemodiálise no município de Caratinga – MG.** [Dissertação] Caratinga: Programa de Pós Graduação em Meio Ambiente e Sustentabilidade; 2007.
5. Baker MJ, Trevisan J, Bassan P, Bhargava R, Butler HJ, Dorling KM, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc.** 2014 Aug;9(8):1771-91.
6. Bastos MG, Bregman R, Kirsztain GM. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev Assoc Med Bras.** 2010;56(2): 248-53.
7. Baynes, J. W. Role of Oxidative Stress in Development of Complications in Diabetes. **Diabetes.** 1991 (40): 405-412.

8. Bayraktar G, Kazancioglu R, Bozfakioglu S, Yildiz A, Ark E. Evaluation of salivary parameters and dental status in adult hemodialysis patients. **Clin Nephrol.** 2004 Nov;62(5):380-3.
9. Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, Picarro IC, Schor N. Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. **Med Sci Sports Exerc.** 1997;29(2):169-74.
10. Bossola M, Tazza L. Xerostomia in patients on chronic hemodialysis. **Nat Rev Nephrol.** 2012 Jan 17;8(3):176-82.
11. Carpenter GH, Proctor GB, Anderson LC, Zhang XS, Garrett JR. Immunoglobulin A secretion into saliva during dual sympathetic and parasympathetic nerve stimulation of rat submandibular glands. **Exp Physiol.** 2000 May;85(3):281-6.
12. Catalán MA, Nakamoto T, Melvin JE. The salivary gland fluid secretion mechanism. **J Med Invest.** 2009;56 Suppl:192-6.
13. de Santo NG, Capasso G, Malnic G, Anastasio P, Spitali L, D'Angelo A. Effect of an acute oral protein load on renal acidification in healthy humans and in patients with chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol.** 1997 May;8(5):784-92.
14. Ellis KJ, Martino A, Yasumura S, Brook D, Cohn SH, Letteri JM. Distribution of calcium in the rat due to chronic renal failure. **Nephron.** 1977;18(2):124-31.
15. Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS. Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. **J Cell Sci.** 1995 Sep;108 (Pt 9):2993-3002.

16. Gámez-Méndez AM, Vargas-Robles H, Arellano-Mendoza M, Cruz-Laguna E, Rios A, Escalante B. Early stage of obesity potentiates nitric oxide reduction during the development of renal failure. **J Nephrol.** 2014 Jun;27(3):281-7.
17. Gava AL, Freitas FP, Balarini CM, Vasquez EC, Meyrelles SS. Effects of 5/6 nephrectomy on renal function and blood pressure in mice. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.** 2012;4(3):167-73.
18. Giunti S, Barit D, Cooper ME. Mechanisms of diabetic nephropathy: role of hypertension. **Hypert.** 2006 Oct;48(4):519-26.
19. Grassi G, Quarti-Trevano F, Seravalle G, Arenare F, Volpe M, Furiani S, et al. Early sympathetic activation in the initial clinical stages of chronic renal failure. **Hypertension.** 2011 Apr;57(4):846-51.
20. Hall ME, do Carmo JM, da Silva AA, Juncos LA, Wang Z, Hall JE. Obesity, hypertension, and chronic kidney disease. **Int J Nephrol Renovasc Dis.** 2014 Feb 18;7:75-88. doi: 10.2147/IJNRD.S39739. eCollection 2014
21. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** 2004; 142(2): 231-55.
22. Hotta O, Furuta T, Chiba S, Tomioka S, Taguma Y. Regression of IgA nephropathy: a repeat biopsy study. **Am J Kidney Dis** 2002;39:493-502.
23. Huang L, Regan JM, Quan X. Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode microbial fuel cells. **Bioresour Technol.** 2011 Jan;102(1):316-23.
24. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent.** 2001 Feb;85(2):162-9.

25. Ienaga K, Yokozawa T. Treatment with NZ-419 (5-Hydroxy-1-methylimidazoline-2,4-dione), a novel intrinsic antioxidant, against the progression of chronic kidney disease at stages 3 and 4 in rats. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(5):809-15.
26. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016 Nov 29. pii: 1535370216681550.
27. Kaufman K, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;12(2):197-212.
28. Kaushik A, Reddy SS, Umesh L, Devi BK, Santana N, Rakesh N. Oral and salivary changes among renal patients undergoing hemodialysis: A cross-sectional study. *Indian J Nephrol.* 2013 Mar;23(2):125-9.
29. Kirsztajn GM, Bastos MG, Andriolo A. Proteinuria and serum creatinine: critical tests for diagnosis chronic kidney disease. *J Bras Patol Med Lab.* 2011 Abr;47(2):100-103.
30. Khaustova S, Shkurnikov M, Tonevitsky E, Artyushenko V, Tonevitsky A. Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst.* 2010 Dec;135(12):3183-92.
31. Kho HS, Lee SW, Chung SC, Kim YK. Oral manifestations and salivary flowrate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(3):316-9.
32. Knepper M, Burg M. Organization of nephron function. *Am J Physiol.* 1983 Jun;244(6):F579-89.

33. Lankarani MM, Assari S. Diabetes, Hypertension, Obesity and Long Term Risk of Renal Disease Mortality; Racial and Socioeconomic Differences. **J Diabetes Investig.** 2017 Jan 11. doi: 10.1111/jdi.12618.
34. Lasisi TJ, Raji YR, Salako BL. Salivary creatinine and urea analysis in patients with chronic kidney disease: a case control study. **BMC Nephrol.** 2016 Jan 16;17:10.
35. Lawrence HP. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnostic of disease and monitoring of general health. **J Can Dent Assoc.** 2002 Mar; 68(3):170-174.
36. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. **Lancet.** 2012 Jan 14;379(9811):165-80.
37. Li P, Ma LL, Xie RJ, Xie YS, Wei RB, Yin M, et al. Treatment of 5/6 nephrectomy rats with sulodexide: a novel therapy for chronic renal failure. **Acta Pharmacol Sin.** 2012 May;33(5):644-51.
38. Li X, Xiang X, Hu J, Goswami R, Yang S, Zhang A, et al. Association Between Serum Cortisol and Chronic Kidney Disease in Patients with Essential Hypertension. **Kidney Blood Press Res.** 2016;41(4):384-91.
39. López ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chernonagura A. SalivaryCharacteristics of Diabetic Children. **Braz Dent J.** 2003 Jul; 14(1):26-31.
40. Loria KS. **Saúde bucal, práticas de higiene bucal e ocorrência de insuficiência renal crônica** [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação] Piracicaba: Faculdade de Odontologia/Universidade Estadual de Campinas; 2013.

41. Mancia G, Grassi G, Giannattasio C, Seravalle G. Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage. **Hypertension**. 1999 Oct;34(4 Pt 2):724-8.
42. Mandel ID. The diagnostic uses of saliva. **J Oral Pathol Med**. 1990 Mar;19(3):119-25.
43. Mangos JA, Maragos N, Mcsherry NR. Micropuncture and microperfusion study of glucose excretion in rat parotid saliva. **Am J Physiol**. 1973;224(6): 1260-12644.
44. Martin WF, Armstrong LE, Rodriguez NR. Dietary protein intake and renal function. **Nutr Metab (Lond)**. 2005 Sep 20;2:25.
45. Martinez JR. Ion transport and water movement. **J Dent Res**. 1987;66: 638-47.
46. Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira BB. A curva de ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**. 2003;11(1):7-31.
47. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu Rev Physiol**. 2005;67:445-69.
48. Mikkonen JJ, Raittila J, Rieppo L, Lappalainen R, Kullaa AM, Myllymaa S. Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Photoacoustic Spectroscopy for Saliva Analysis. **g** 2016 Sep;70(9):1502-10.
49. Moura SAB, Medeiros AMC, Costa FRH, Moraes PH, Oliveira Filho AS. Valor Diagnóstico da Saliva em Doenças Orais e Sistêmicas: Uma Revisão de Literatura. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. 2007; 7(2):187-194
50. Nunes GLS. Avaliação da função renal em pacientes hipertensos. **Rev Bras Hipertens**. 2007;14(3):162-166.

51. Pallos D, Leão MV, Togeiro FC, Alegre L, Ricardo LH, Perozini C, et al. Salivary markers in patients with chronic renal failure. 50. **Arch Oral Biol.** 2015 Dec;60(12):1784-8.
52. Peng CH, Xia YC, Wu Y, Zhou ZF, Cheng P, Xiao P. Influencing factors for saliva urea and its application in chronic kidney disease. **Clin Biochem.** 2013 Feb;46(3):275-7.
53. Pereira AA. Alterações **Químicas e Físicas de Tecidos Duros Irradiados por Laser de Neodímio Chaveado.** [tese] São Paulo: Ciências da Saúde/Universidade de São Paulo.2003.
54. Popovska M, Spasovski G, Orovcanec N, Cekovska S, Simonceva M, Bexeti-Zendeli L, et al. Oral findings in end-stage renal disease. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki).** 2013;34(3):85-91.
55. Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr.** 2007; 85(3): 837-44
56. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev.** 2008 Oct;88(4):1243-76.
57. Raff H, Trivedi H. Circadian rhythm of salivary cortisol, plasma cortisol, and plasma ACTH in end-stage renal disease. **Endocr Connect.** 2012 Nov 19;2(1):23-31.
58. Rennke HG, Patel Y, Venkatachalam MA. Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat. **Kidney Int.** 1978 Apr;13(4):278-88.

59. Romero AC. **Alterações salivares na disfunção renal crônica em ratos induzida por 5/6 de nefrectomia.** [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia: Universidade de São Paulo; 2013.
60. Romero AC, Bergamaschi CT, de Souza DN, Nogueira FN. Salivary Alterations in Rats with Experimental Chronic Kidney Disease. **PLoS One.** 2016 Feb 9;11(2):e0148742.
61. Romero F, Rodríguez-Iturbe B, Parra G, González L, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. **Kidney Int.** 1999 Mar;55(3):945-55.
62. Sabino-Silva R, Okamoto MM, David-Silva A, Mori RC, Freitas HS, Machado UF. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. **Diabetol Metab Syndr.** 2013 Oct 24;5(1):64.
63. Sabino-Silva R, Freitas HS, Lamers ML, Okamoto MM, Santos MF, Machado UF. Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. **J Membr Biol.** 2009 Mar;228(2):63-9.
64. Sabino-Silva R, Alves-Wagner AB, Burgi K, Okamoto MM, Alves AS, Lima GA, et al. SGLT1 protein expression in plasma membrane of acinar cells correlates with the sympathetic outflow to salivary glands in diabetic and hypertensive rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2010 Dec;299(6):E1028-37.
65. Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte;** 2004; 10(4):308-313.

66. Schwartz SS, ZhuWX, Sreebny L. M. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. **Arch Oral Biol.** 1995 Oct;40(10):949-958.
67. Shannon IL, Feller RP, Eknayan G, Suddick RP. Human parotid saliva urea in renal failure and during dialysis. **Arch Oral Biol.** 1977;22:83-6.
68. Shimizu MHM. **A N-acetilcisteína atenua a progressão da doença renal crônica.** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2005.
69. Silva G, Nóbrega JYL, Nóbrega AL, Araújo RLD, Silva NQ, Nóbrega MF, et al. Percepção de portadores de doença renal crônica com relação ao tratamento hemodialítico. **Int.** 2015 Jun;9(1):23-30.
70. Silva LS, Pereira DF, Lage MRG, Silva LS, Cotta RM. Prevalência da doença renal crônica em portadores de hipertensão arterial. **Joun. of Manag. and Primary Health Care.** 2016;7(1):53-53.
71. Smets P, Meyer E, Maddens B, Daminet S. Cushing's syndrome, glucocorticoids and the kidney. **Gen Comp Endocrinol.** 2010 Oct;169(1):1-10.
72. Stevens PE, Levin A. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. **Ann Intern Med.** 2013 Jun 4;158(11):825-30.
73. Szabo AJ, Muller V, Chen GF, Samsell LJ, Erdely A, Baylis C. Nephron number determines susceptibility to renal mass reduction-induced CKD in Lewis and Fisher 344 rats: implications for development of experimentally induced chronic allograft nephropathy. **Nephrol Dial Transplant.** 2008 Aug;23(8):2492-5.

74. Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL. Excretion of sodium, potassium, chloride e carbon dioxide in human parotid saliva. **Am J Physiol.** 1954;178(1):155-159.
75. Thorman R, Lundahl J, Yucel-Lindberg T, Hylander B. Inflammatory cytokines in saliva: early signs of metabolic disorders in chronic kidney disease. A controlled cross-sectional study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2010 Nov;110(5):597-604.
76. Tomás I, Marinho JS, Limeres J, Santos MJ, Araújo L, Diz P. Changes in salivary composition in patients with renal failure. **Arch Oral Biol.** 2008;53:528-32.
77. Tsuruoka S, Nishiki K, Sugimoto K, Fujimura A. Time of day improves efficacy and reduces adverse reactions of vitamin D3 in 5/6 nephrectomized rat. **Life Sci.** 2002 Aug 30;71(15):1809-20.
78. Turner RJ, Sugiya H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Dis.** 2002 Jan;8(1):3-11.
79. Veiga GL, Nishi EE, Estrela HF, Lincevicius GS, Gomes GN, Simões Sato AY, et al. Total renal denervation reduces sympathoexcitation to different target organs in a model of chronic kidney disease. **Auton Neurosci.** 2016 Dec 1. pii: S1566-0702(16)30269-7.
80. Wang H, Fu W, Jin Z, Wang Y, Yao W, Yin P, et al. Advanced IgA nephropathy with impaired renal function benefits from losartan treatment in rat. **Journal Renal Failure.** 2013; 35(6) 812-818.
81. Wright EM1, Turk E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. **Pflugers Arch.** 2004 Feb;447(5):510-8. Epub 2003 May 14.
82. Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. **Physiol Rev.** 2011 Apr;91(2):733-94.

83. Wyatt RJ, Julian BA. IgA Nephropathy. **The New England Journal of Medicine.** 2013;368(25):2402-2414.
84. Yarat A, Tunali T, Pisiriciler R, Akyuz S, Ipbuker A, Emekli N. Salivary thromboplastic activity in diabetics and healthy controls. **Clin Oral Investig.** 2004 Mar;8(1):36-39.
85. Young JA, Martin CJ, Asz M, Weber FD. A microperfusion investigation of bicarbonate secretion by the rat submaxillary gland. The action of a parasympathomimetic drug on electrolyte transport. **Pflugers Arch.** v.319, p. 185-199, 1970.
86. Young JA. Microperfusion investigation of chloride fluxes across the epithelium of the main excretory duct of the rat submaxillary gland. **Pflugers Arch.** 1968;303(4):366-74.
87. Zeuthen T. Molecular water pumps. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** v.141, p. 97-151, 2000
88. Zilch O, Vos PF, Oey PL, Cramer MJ, Ligtenberg G, Koomans HA, Blankestijn PJ. Sympathetic hyperactivity in haemodialysis patients is reduced by short daily haemodialysis. **J Hypertens.** 2007 Jun;25(6):1285-9.

ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação de mecanismos moleculares envolvidos na hipossalivação em modelo experimental de insuficiência renal crônica”, protocolo nº 092/15, sob a responsabilidade de **Robinson Sabino da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **27 de novembro de 2015**.

(We certify that the project entitled "Avaliação de mecanismos moleculares envolvidos na hipossalivação em modelo experimental de insuficiência renal crônica", protocol 092/15, under the responsibility of Robinson Sabino da Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of November 27th, 2015).

Vigência do Projeto	Início: 20/12/2015 / Término: 01/06/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	- / Ratos Wistar
Número de animais	30
Peso / Idade	250g / 2 meses
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério Central da UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 28 de janeiro de 2016.



Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail:ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 009/16 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 092/15**

Projeto Pesquisa: “Avaliação de mecanismos moleculares envolvidos na hipossalivação em modelo experimental de insuficiência renal crônica”.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 28 de janeiro de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU