



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



DANIELE MORAIS DIAS

Alterações moleculares em glândulas salivares na doença renal crônica

Uberlândia
2017

DANIELE MORAIS DIAS

**Alterações moleculares em glândulas salivares
na doença renal crônica**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado
a Faculdade de Odontologia da UFU, como
parte das exigências para a obtenção do título
de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

Co-orientadora: Ms. Fernanda Ladico Miura

Uberlândia

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A)
DISCENTE **Daniele Morais Dias** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

No dia quatro de julho de 2017, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo (a) aluno (a) **Daniele Morais Dias**, COM O TÍTULO: **"ALTERAÇÕES MOLECULARES EM GLÂNDULAS SALIVARES NA DOENÇA RENAL CRÔNICA"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

Uberlândia, 04 de julho de 2017

Profa. Dra. Alexandra de Melo Castro Prado
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Profa. Dra. Fabiana Sodré de Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Thays Crosara Abrão Cunha
Aluno de Doutorado – PPQO/UFU

Aprovado/Reprovado

Dedico este trabalho de conclusão de curso ao meu irmão Kayke Morais Dias (*in memorian*) que sempre foi meu anjo da guarda e grande incentivador em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por tornar meus sonhos realidade e principalmente, por ter me concedido forças para chegar ao término dessa caminhada.

Aos meus pais, Ademar e Rosinéia, pelo amparo, confiança, por acreditarem no meu potencial e nunca terem medido esforços para realizar aquilo que Deus colocou no meu coração. Muito além, pelo amor imensurável que tens por mim.

Ao meu orientador, Professor Robinson Sabino-Silva, por me fazer crescer como profissional, me ensinar várias vezes com sua sutileza e paciência a como reagir frente a diversas situações, por todo aprendizado mediante a sua grande capacidade intelectual. E, principalmente, pela oportunidade de conviver com essa pessoa tão humana que tenho certeza que levarei seus ensinamentos por toda minha vida.

À minha coorientadora Mestre Fernanda Ladico Miura por dividir comigo todos os momentos de dificuldade tornando-os mais leves e alegres, bem como os momentos divertidos em que pudemos expandir nosso convívio profissional para uma amizade.

À minha família (irmãos, primos, tios e avós) pela força, orações e contribuições para que este dia chegasse. Mais ainda pela compreensão sobre minhas ausências.

Às minhas amigas e pessoas queridas que sempre me apoiaram, incentivaram e tiveram orgulho de mim.

Ao meu namorado Rafael que assim como minha família, foi meu alicerce durante minha vida acadêmica.

Ao Instituto de Ciência Biomédicas da UFU (ICBIM) e à equipe do Centro de Pesquisa de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular - CPBio da UFU que tornaram este trabalho possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo auxílio financeiro a pesquisa.

Aos amigos que fiz durante minha vida letiva, estes que sempre com humor mesmo nos piores dias, sabiam como tirar um sorriso, como encarar a vida com menos seriedade sem deixar de lado nossas responsabilidades.

Enfim, agradeço a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia e toda sua equipe (professores, técnicos, funcionários e afins) por todos esses cinco anos de convívio e principalmente de aprendizado.

“Desejo que a vida se torne um canteiro de oportunidades para você ser feliz. E, quando você errar o caminho, recomece. Pois assim você descobrirá que ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas, usar as lágrimas para irrigar a tolerância, as perdas para refinar a paciência, as falhas para lapidar o prazer, os obstáculos para abrir as janelas da inteligência. Jamais desista de si mesmo”.

(Augusto Cury)

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é considerada um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Sabe-se que os portadores de DRC podem apresentar alterações orais, no entanto, o efeito desta doença sistêmica em glândulas salivares ainda são muito pouco estudados. Dessa forma, o presente trabalho visou investigar os efeitos da DRC na composição molecular de glândulas salivares. Para isto, ratos Wistar com 8 semanas de idade foram divididos em controles e DRC. Quarenta e cinco (dias) após a indução da DRC por meio de nefrectomia 5/6, os ratos foram anestesiados e as glândulas salivares foram removidas, pesadas e armazenadas. O perfil da composição química e as concentrações de amilase, Imunoglobulina A (IgA), cortisol e proteínas totais das glândulas salivares foram analisadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os dados demonstraram que o peso corporal permaneceu inalterado na DRC comparado ao grupo controle. O consumo de água, a uremia e o peso do rim aumentaram ($P<0,05$) na DRC comparado ao grupo controle após 6 semanas. O peso das glândulas salivares parótidas e submandibulares foram semelhantes ($P<0,05$) nos ratos controles e DRC. A análise da espectroscopia FTIR da glândula submandibular demonstrou que os grupamentos C_6H_5 (fenil) e as proteínas glicosiladas foram reduzidos ($P<0,05$) no grupo DRC em comparação com os controles. A parótida de animais DRC apresentou níveis reduzidos ($P<0,05$) de amida I, amida II e IgA associados com níveis aumentados ($P<0,05$) de ácidos graxos, lipídios e proteínas glicosiladas. Em conjunto, demonstramos que animais DRC apresentam alterações glandulares mais significativas na glândula parótida em comparação com a submandibular. Acreditamos que as alterações descritas neste trabalho podem ser relacionadas com as alterações salivares, o que se reflete nas condições de saúde oral, de indivíduos com DRC.

Palavras Chave: Doença Renal Crônica, Glândulas Salivares, IgA, Cortisol.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is considered a serious public health problem throughout the world. It is known that patients with CKD can present oral alterations, however, the effect of this systemic disease on salivary glands are still unknown. Thus, the present work aimed to investigate the effects of CKD on the molecular composition of salivary glands. For this, 8 week old Wistar rats were divided into controls and DRC. Forty-five (days) after CKD induction by nephrectomy 5/6, the rats were anesthetized and salivary glands were removed, weighed and stored. The chemical composition profile and the concentrations of amylase, Immunoglobulin A (IgA), cortisol and total proteins of the salivary glands were analyzed by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Data showed body weight remained unchanged in CKD compared to controls. Water intake, uremia, and kidney weight increased ($P < 0.05$) in CKD compared to the control group after 6 weeks. The weight of the salivary glands were similar ($P < 0.05$) in DRC than control rats. An analysis of FTIR spectroscopy of the submandibular gland showed that C6H5 (phenyl) and glycosylated proteins were reduced ($P < 0.05$) compared to controls. Parotid of DRC animals showed reduced levels ($P < 0.05$) of amide I, amide II and IgA associated with increased ($P < 0.05$) fatty acids, lipids and glycosylated proteins. Taken together, we showed that DRC animals had more significant glandular changes in parotid than submandibular gland. We believe that changes in salivary glands describes in this study may be related to salivary changes, which is reflected in the oral health conditions of individuals with CKD.

Keywords: Chronic Renal Disease, Salivary glands, IgA and Cortisol.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
OBJETIVO.....	14
MATERIAIS E MÉTODO.....	15
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXOS.....	33

INTRODUÇÃO

• DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) pode ser definida como uma síndrome que se caracteriza pela destruição dos néfrons de forma lenta e progressiva (De Rossi SS et al., 1996). A DRC pode ser dividida em seis estágios de acordo com o seu grau de severidade (Levey et al., 2003): fase de função renal normal sem lesão renal, fase de lesão com função renal normal, fase de insuficiência renal funcional ou leve, fase de insuficiência renal laboratorial ou moderada, fase de insuficiência renal clínica ou severa e fase terminal de insuficiência renal crônica (Sesso et al., 2010). A DRC possui caráter irreversível e atinge as funções glomerular, tubular e endócrina dos rins (Abboud et al., 2010).

Estágio	Filtração	Grau da DRC
0	> 90	Grupos de Risco para DRC Ausência de Lesão Renal
1	> 90	Lesão Renal com Função Normal
2	60 - 89	DR Leve ou Funcional
3	30 - 59	DR Moderada ou Laboratorial
4	15 - 29	DR Severa ou Clínica
5	< 15	DR Terminal ou Dialítica

Tabela 1: Estágios Doença Renal Crônica

Os estágios iniciais da DRC são caracterizados por danos nos rins e normalmente são assintomáticos. Com o aumento da severidade da DRC, a função renal se deteriora ainda mais e pode levar ao quadro de doença renal terminal (Levey et al., 2003). Em todo o mundo aproximadamente 1,8 milhões de pessoas apresentam DRC em estágio terminal. Desta forma, estes pacientes necessitam de tratamento, tendo como alternativa a hemodiálise, diálise peritoneal ou o transplante renal (Grassmann et al., 2004). No Brasil, os portadores de DRC que realizam hemodiálise ultrapassam 100.000 pacientes (Bastos et al., 2004). Percebe-se que a

incidência da DRC aumentou nos últimos anos, destacando-se a incidência duplicada nos últimos 15 anos (Singh et al., 2013).

As doenças renais contribuem para um aumento dos níveis de morbidade e mortalidade. A DRC é um problema global que necessita de detecção precoce, avaliação e gestão preventiva para retardar a progressão e prevenir resultados indesejáveis (Nandan et al., 2005). Sabe-se que o rim consegue manter sua função em níveis adequados até a destruição aproximada de metade dos néfrons. Após este estágio, com perda da sua capacidade compensatória, intensifica-se o desencadeamento das manifestações clínicas da doença (Jorge et al., 2000). Isto ocorre pois a reduzida taxa de filtração glomerular desencadeia um acúmulo de subprodutos metabólicos (como a ureia e a creatinina) e um desequilíbrio dos eletrólitos no sangue. O desequilíbrio destes fatores pode desencadear problemas severos em múltiplos órgãos e até mesmo a morte (Tomás et al., 2008).

• FISIOLOGIA DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares fazem parte do sistema digestório e se originam no ectoderma sendo classificadas como glândulas exócrinas. O parênquima da glândula salivar é composto de uma intrincada relação de ácinos, ductos e células mioepiteliais (Dodds et al., 2005). As principais células secretoras presentes nas glândulas salivares são as serosas e mucosas que se diferenciam pelos componentes que sintetizam. No primeiro caso, são produzidas principalmente proteínas e glicoproteínas, com atividades enzimáticas. No segundo, o principal produto são as mucinas que apresentam importante papel na lubrificação e formação de uma barreira nas superfícies orais. (Dodds et al. 2005).

As glândulas salivares são responsáveis pela produção da saliva e podem ser classificadas em maiores (parótida, submandibular e sublingual) e menores (entre 700 e 900 distribuídas por toda a cavidade oral). A importância da saliva para a saúde oral é bem conhecida. As múltiplas funções da saliva ocorrem tanto pela sua característica fluida como pelos componentes específicos (proteínas, íons e glicose). (Edgar, 1992; Humprey et al., 2001).

A secreção salivar é coordenada pelo sistema nervoso simpático e parassimpático. O estímulo da inervação parassimpática para as glândulas salivares é desencadeado pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh). A ACh se liga em

receptores muscarínicos do tipo M3 presentes na membrana basolateral das células acinosas. Esta ligação promove uma mudança conformacional no receptor M3 e ativação da proteína G acoplada a M3. A subunidade α da proteína G pode estimular a 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. O efluxo de cloreto dentro do lúmen atrai íons sódio, transportado via paracelular, bem como moléculas de água (via para e transcelular). O gradiente osmótico gera a secreção do fluido, o que forma a saliva primária (Humphrey et al., 2001; Turner et al., 2002; Nicolau, 2008).

Grande parte da secreção de água ocorre por meio de canais de membrana denominados aquaporinas, principalmente pelo subtipo 5 que ficam localizados na membrana luminal das células acinosas (Ishikawa, 2000). A indução da secreção salivar em humanos ocorre pelo aumento da concentração intracelular de cálcio (Ca^{2+}) via fosfolipase C e aumento da translocação de aquaporinas 5 nas células acinares das glândulas parótidas e submandibulares (Li et al, 2006).

No segundo estágio da secreção, os ductos estriados possuem um importante papel na modificação da saliva produzida na região acinar. Essa modificação consiste na reabsorção de íons Na^+ e Cl^- (em maior quantidade) e secreção de íons K^+ e HCO_3^- (bicarbonato), o que torna a saliva hipotônica em relação ao plasma (Dodds, et al. 2005)

O ducto excretor possui diâmetro maior do que o ducto estriado e é revestido por epitélio pseudoestratificado colunar na porção inicial. À medida que se afasta do ácino, o ducto excretor gradativamente passa a ser revestido por epitélio estratificado, este componente conduz a saliva até a cavidade oral. (Dodds, M. W. J. et al. 2005).

- **ALTERAÇÕES ORAIS NA DOENÇA RENAL CRÔNICA**

Os pacientes com DRC em tratamento dialítico apresentam níveis mais altos de complicações orais, redução na taxa do fluxo salivar e alterações na composição da saliva (Seethalakshmi et al., 2014; Seraj et al., 2011). Dentre as alterações mais

comuns na cavidade oral nos pacientes submetidos a este tratamento, podemos citar a xerostomia (o que consequentemente induz o indivíduo a ingerir uma maior quantidade de líquidos), doenças periodontais, halitose, estomatite urêmica, fluxo salivar diminuído e inflamação no parênquima das parótidas. Frequentemente os pacientes descrevem halitose matinal, o que está associado com altas concentrações salivares ureia amônia oriundas do metabolismo sistêmico (Kho HS et al., 1999) Além das alterações metabólicas decorrentes da falência renal na cavidade oral, é importante destacar que a DRC também possui implicações importantes na prática odontológica, entre elas: restrições ao uso de determinados medicamentos e alterações orais desencadeadas pela terapia imunossupressora em pacientes transplantados (Eversole, 2004; Proctor et al. 2005).

A análise da composição molecular de tecidos biológicos pelo espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido utilizada em uma série de doenças com grande eficácia. Esta técnica permite identificar com grande acurácia as terminações C-H, O-H e N-H de proteínas, a composição lipídica e compostos glicídicos por meio de FTIR (Khaustova et al., 2010). Além disso, os portadores de DRC ainda apresentam frequentemente sintomas álgicos na língua e mucosas orais, gengivite, periodontite e alta prevalência de cálculo dental. Aparentemente, não ocorre correlação com a manifestação da doença cárie, uma vez que as alterações salivares e orais descritas tornam a cavidade oral um ambiente mais propício para o desencadeamento das doenças periodontais. (Romero et al. 2016)

OBJETIVO

O presente trabalho tem o objetivo de investigar o efeito da Doença Renal Crônica na composição molecular de glândulas salivares em um modelo animal de nefrectomia 5/6.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando animais controles e DRC buscaremos:

- Analisar o peso das glândulas parótida, submandibular e sublingual;

- Avaliar a composição molecular de componentes proteicos, lipídicos e carboidratos de glândulas parótidas e submandibulares.
- Avaliar a composição de amilase, cortisol, IgA e proteínas totais em glândulas parótidas e submandibulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo 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), e estão de acordo com os Princípios Éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

1. Animais

Para este estudo foram utilizados 18 ratos Wistar machos com 8-10 semanas pesando cerca de 300 g obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU nas seguintes condições:

- a) ciclo de 12/12 horas de claro/escuro;
- b) temperatura ambiente 22 ± 2 °C;
- c) oferta plena de água e ração para roedores.

Para minimizar os efeitos circadianos, todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 10h00min e 12h00min e os animais estudados foram:

- **Controle (n=8):** ratos de três meses que não foram submetidos ao procedimento cirúrgico;
- **DRC (n=10):** ratos de três meses que receberam cirurgia para remoção renal tipo 5/6.

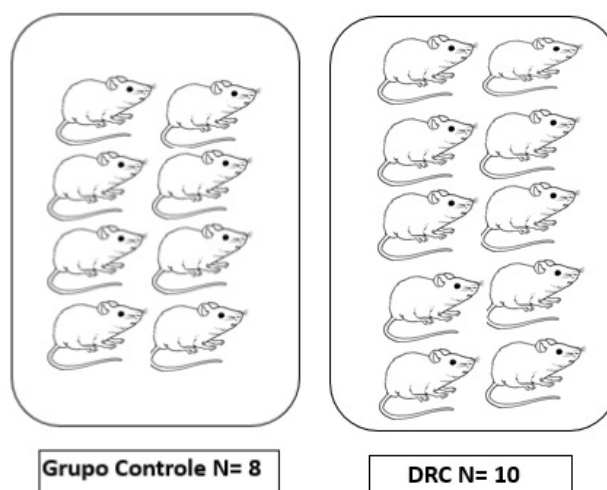


Figura 1: Grupos Experimentais

2. Indução da DRC

Para a indução da DRC os animais foram submetidos à ablação de 5/6 da massa renal (Figura 2) 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 realizada uma ligadura de duas ramificações da artéria renal esquerda com fio mononylon 6-0. Os animais foram estudados 45 dias após a nefrectomia.

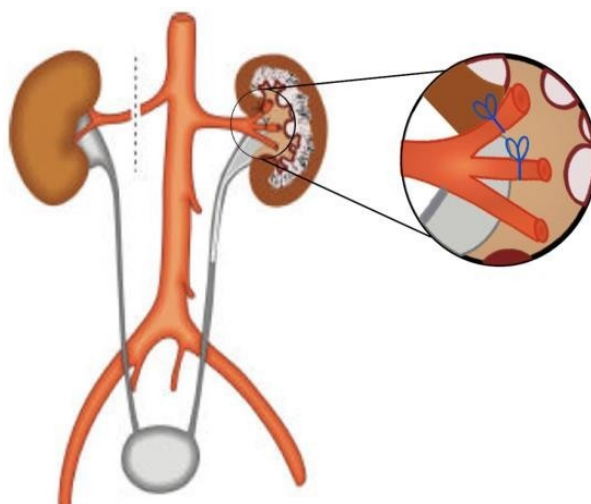


Figura 2: Modelo experimental de indução da Nefropatia Crônica. (Imagem modificada) (Shimizu, 2005; Romero, 2013).

Os animais foram alocados em metabólicas por um período de 12 horas, aos 15, 30 e 45 dias após a indução da doença renal crônica ou

tempo equivalente nos controles. Nas gaiolas metabólicas foi realizada a coleta de urina e mensurado o volume de consumo de água pelos animais. Para a coleta das glândulas salivares 45 dias após a indução de DRC, ou tempo equivalente nos controles, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilasina (12 mg/kg) por via intraperitoneal. Todas as drogas e reagentes foram adquiridos na Sigma Chemical (St. Louis, Mo, EUA) (Figura 3).

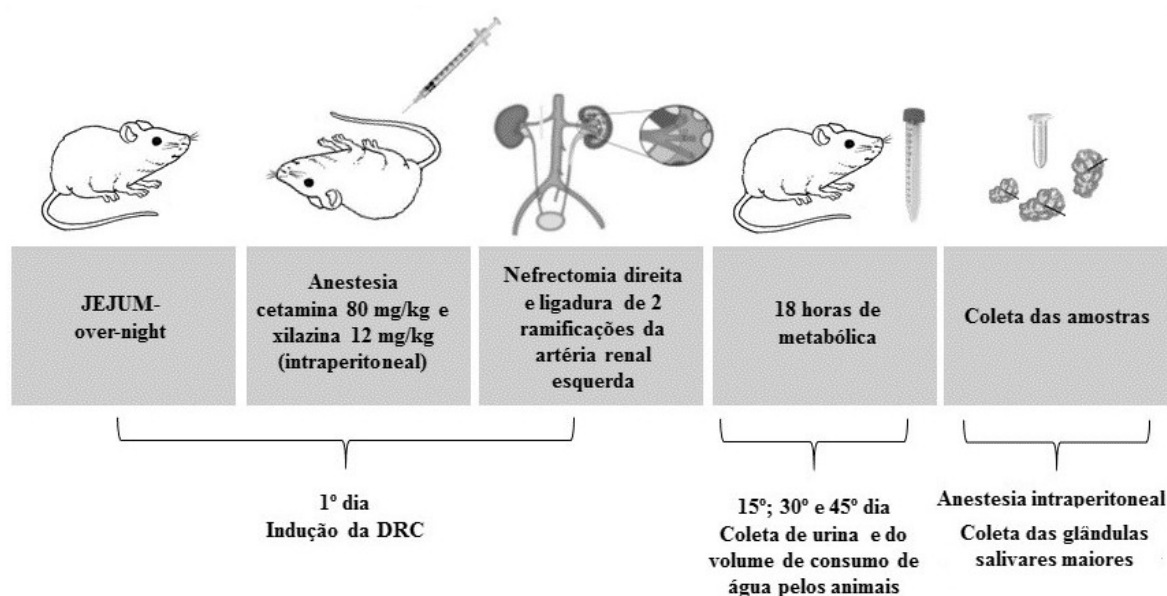


Figura 3: Modelo Experimental do Estudo.

3. PESO CORPORAL

O peso corporal dos ratos dos grupos controle e DRC foi verificado no dia da cirurgia e 45 dias após a indução da DRC (ou equivalente).

4. PESO DO RIM REMANESCENTE

Em seguida, foi realizada uma sobredosagem de tiopental sódico e o rim remanescente foi removido. O tecido adjacente do rim foi descartado, e os rins remanescentes foram pesados.

5. AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES GLANDULARES POR MEIO DE FTIR

Considerando que a espectroscopia no infravermelho é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente, avaliamos a

composição das glândulas 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 análise de FTIR apresenta uma profundidade de penetração da amostra que varia entre 0,1 e 2 μm e depende do comprimento de onda, do índice de refração 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 microgramas de glândulas salivares parótidas e submandibulares liofilizadas em sistema Speed-Vac (Thermo Savant, San Jose, CA) foram utilizadas para obter espectros de amostra. O espectro de ar foi utilizado como *background* na análise FTIR. O espectro de glândulas salivares foi delimitado com 4 cm^{-1} de resolução e 32 varreduras foram realizadas para análise de cada amostra (Khaustova et al., 2010).

Foram avaliadas amostras de glândulas parótidas e submandibulares de animais controles e DRC. De acordo com os parâmetros abaixo obtivemos os índices de absorbância/ concentração dos componentes moleculares.

Número de Onda	Modo Vibracional	Molécula
3668 – 3117	NH e OH	Proteínas
3123 – 2999	NH	Proteínas
2946 – 2891	Ácidos Graxos	Lipídios
2886 – 2837	CH (Lipídios)	Lipídios
1675 – 1621	Amida 1	Proteínas
1594 – 1516	Amida 2	Proteínas
924 – 890	Glicosilações	Proteínas Glicosiladas
714 – 665	Fenil	Proteínas

Tabela 2: Comprimentos de onda e respectivas moléculas

A definição do modo vibracional $\sim 1624 \text{ cm}^{-1}$ foi identificado como Amida I (Christersson et al., 2000, Schultz et al., 1996). A vibração de flexão Amida II foi identificada em 1550 cm^{-1} (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010).

Os modos vibracionais em 1073 cm^{-1} e 890-924 cm^{-1} correspondem às proteínas glicosiladas (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010). O modo vibracional em torno de 690 cm^{-1} representam compostos fenil presentes em proteínas (Diesel et al., 2005; Khaustova et al., 2010). Os outros modos vibracionais estudados estão descritos na tabela 2.

A concentração salivar de cortisol foi determinada em regiões espectrais de

1943-1526 cm^{-1} , 1391-1249 cm^{-1} e 1115-973 cm^{-1} . As regiões espectrais a 1567-1526 e 1488-1406 cm^{-1} determinam a imunoglobulina A secretória (slgA). As regiões espectrais a 1578-144, 1526-1496 e 1444-1305 cm^{-1} determinam a concentração de alfa-amilase (Khaustova et al., 2010). Cálculo do nível de proteína total analisado nas seguintes regiões espectrais: 1503-1440 cm^{-1} , 1317-1249 cm^{-1} e 1190-936 cm^{-1} (Khaustova et al., 2010). A análise detalhada dos modos vibracionais para análise proteica está descrita na tabela 3.

Proteína	Modos Vibracionais
Cortisol 1	1943-1526
Cortisol 2	1391-1249
Cortisol 3	1115-973
IgA1	1567-1526
IgA2	1488-1406
Alfa-Amilase 1	1578-144
Alfa-Amilase 2	1526-1496
Alfa-Amilase 3	1444-1305
Proteínas Totais	1503-1440
Proteínas Totais	1317-1249
Proteínas Totais	1190-936

Tabela 3: Proteínas e seus respectivos modos vibracionais.

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados expressos como média $\pm$ EPM. Foram comparados através de 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

• **Peso dos Animais e Rim Remanescente e Concentração de Creatinina**

O peso corporal antes da indução da DRC não demonstrou diferença ($P > 0,05$) em comparação com animais controles (Figura 4,A). Além disso, 6 semanas após o início dos experimentos, o peso corporal manteve-se inalterado ($P > 0,05$) entre animais controles e DRC (Figura 4, B). Como esperado, o peso do rim remanescente foi aumentado 43% ($P < 0,05$) em ratos DRC quando comparados com controle (Figura 4, C). A concentração de creatinina urinária foi reduzida 52%

($P < 0,05$) em animais DRC em comparação com controles (Figura 4D). Como esperado, a concentração de creatinina sérica foi aumentada 31% ($P < 0,05$) em animais DRC em comparação com controles (Figura 4E).

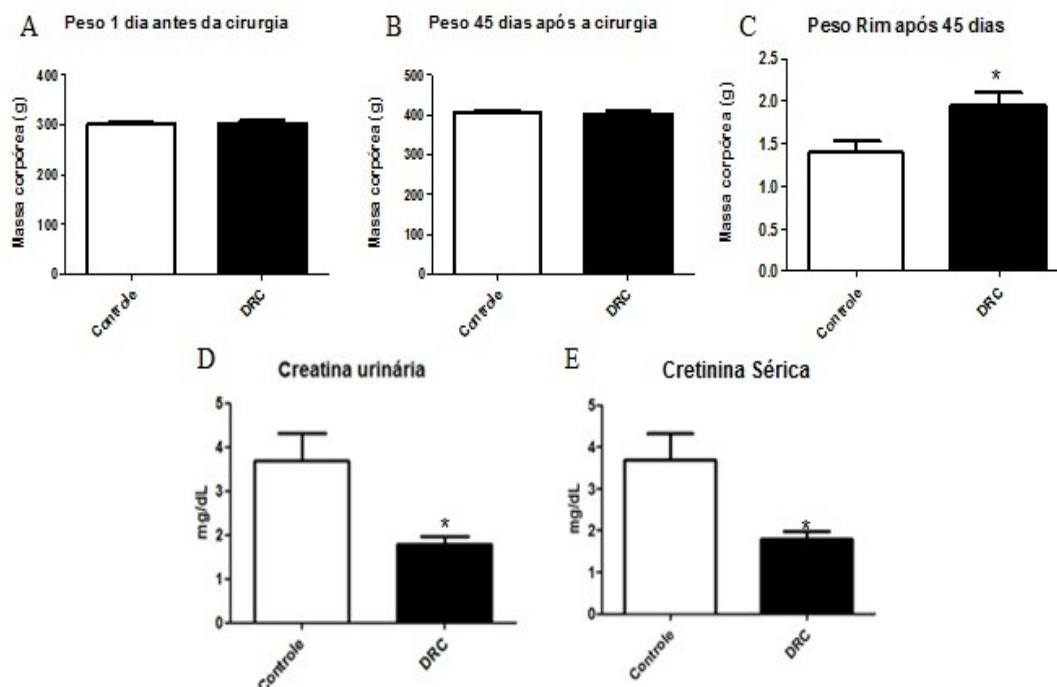


Figura 4: **A-** Peso dos animais 1 dia antes da cirurgia. **B-** Peso dos animais 45 dias após a cirurgia. **C** - Peso do rim remanescente 45 dias após a cirurgia ou simulação em animais controle e doença renal crônica (DRC). **D-** Creatinina urinária coletadas nas 24 horas anteriores do momento da coleta de tecidos realizada 45 dias após a cirurgia ou simulação. **E-** Creatinina sérica após 45 dias de nefrectomia 5/6 ou simulação em animais controle 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.

• Urina e Ingestão de Água

A análise de volume urinário e consumo hídrico foi realizada em um sistema de gaiolas metabólicas apropriadas para este fim (Figura 5). A ingestão de água e o volume de urina foram semelhantes nos ratos controles e DRC nas análises iniciais e foram ocorrendo alterações com o estabelecimento da DRC. Quinze (15 dias) após a cirurgia de nefrectomia 5/6, a ingestão de água e volume de urina permaneceram semelhantes entre animais controles e DRC ($P > 0,05$). A ingestão de água 30 dias após a cirurgia foi semelhante em animais controles e DRC. No entanto, o volume urinário em animais DRC após 30 dias foi aumentado 27% ($P < 0,05$) quando comparado com controles, respectivamente ($P < 0,05$). Após 45 dias, a ingestão de

água aumentou 28% ($P<0,05$) em animais DRC quando comparados com animais controles. De forma paralela, o volume de urina 45 dias após a nefrectomia 5/6 foi aumentado 75% ($P<0,05$) em comparação com controle.

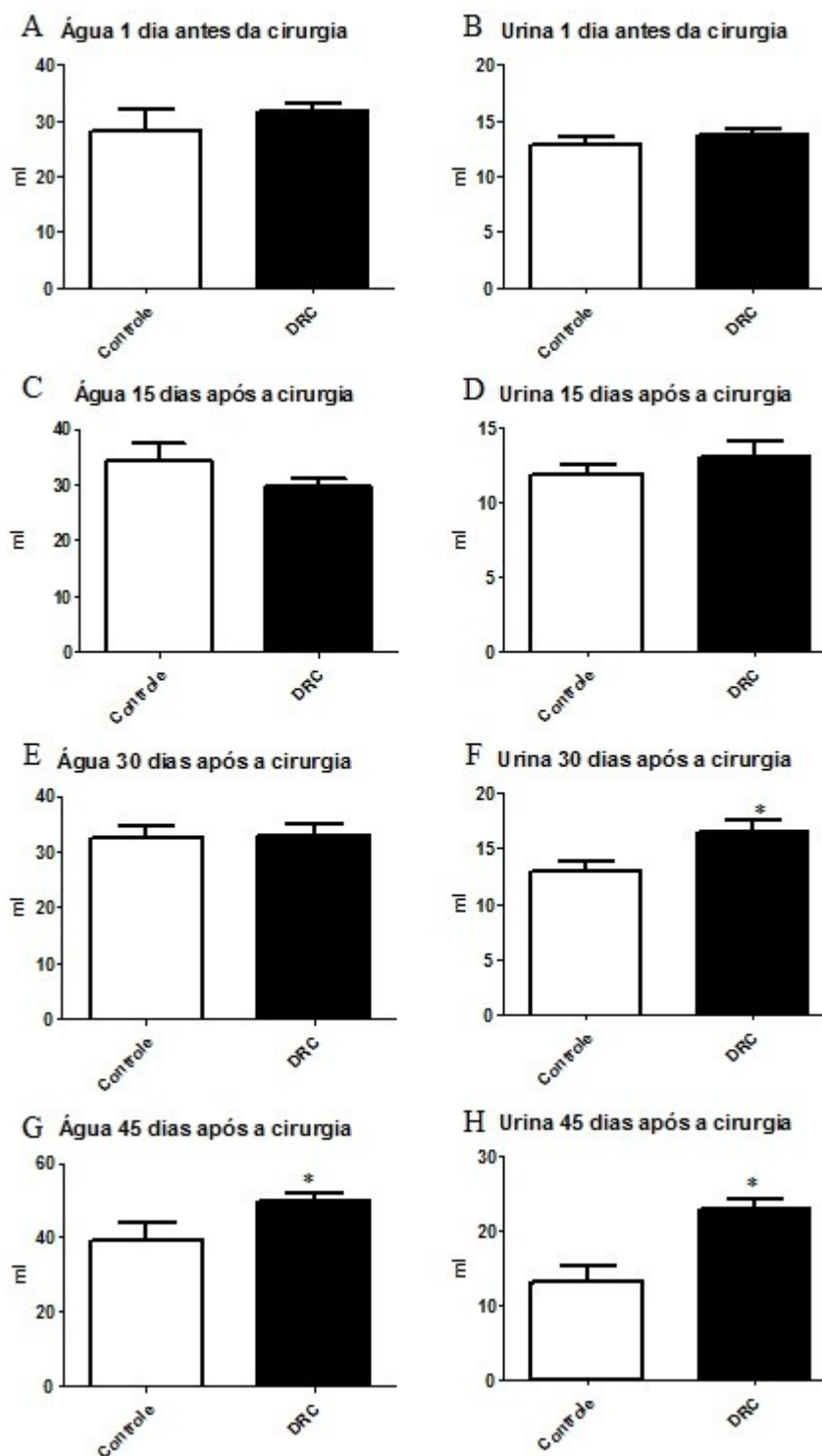


Figura 5: Ingestão hídrica e volume urinário. **A-** Imagem traz a ingestão de água um dia antes da cirurgia. **B-** Volume urinário entre os grupos controle e DRC um dia antes da cirurgia. **C-** Consumo de água após 15 dias da cirurgia. **D-** Volume urinário 15 dias após a cirurgia. **E-** Consumo hídrico após 30 dias de cirurgia. **F-** Volume urinário 30 dias após a cirurgia. **G-** Consumo Hídrico após 45

dias da cirurgia. **H-** Volume urinário após 45 dias. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Teste T Student não pareado. * $P < 0,05$ vs Controle.

• Peso das Glândulas

Ao analisarmos o peso das glândulas salivares parótida (Figura 6A), submandibular (Figura 6B) e sublingual (Figura 6C) verificamos que não ocorreu alteração ($P > 0,05$) entre os animais controle e DRC.

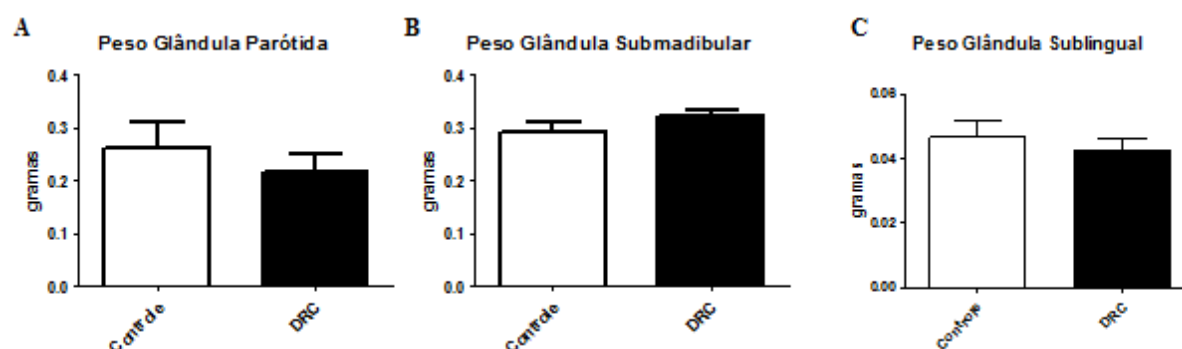


Figura 6: Peso das glândulas salivares e mensuração do fluxo salivar. A- Peso da glândula parótida. B- Peso da glândula submandibular. C- Peso da glândula sublingual. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Teste T Student não pareado. * $P < 0,05$ vs Controle.

Glândulas Salivares

O espectro infravermelho de glândulas salivares 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 das glândulas parótidas e submandibulares de ratos controles e DRC estão representados na figura 7. Foram identificados uma série de modos vibracionais comuns nas duas glândulas conforme descrito na seção de materiais e métodos.

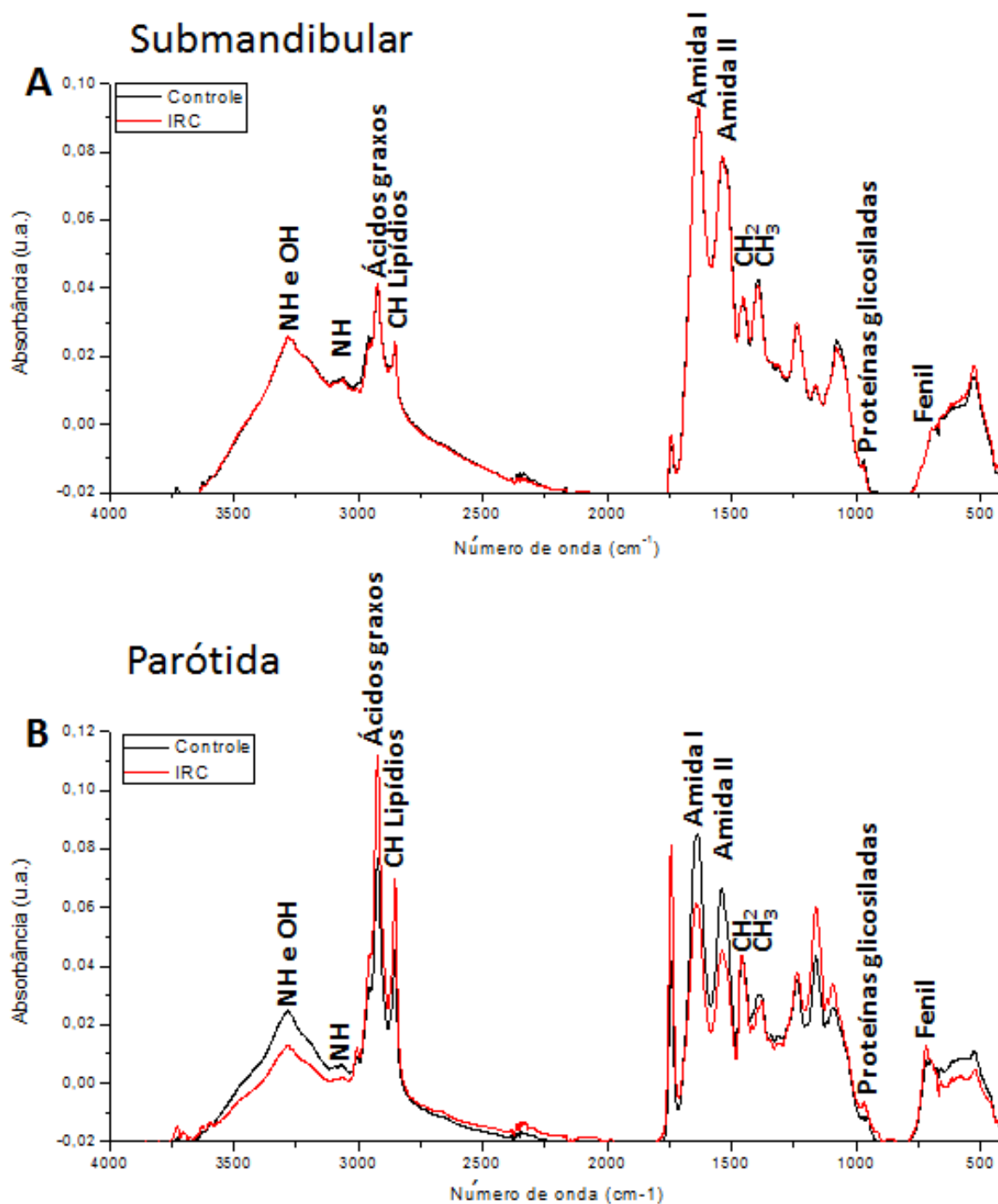


Figura 7: Espectro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em glândulas submandibular (A) e parótidas (B).

Em seguida apresentaremos os gráficos demonstrativos das análises de glândulas submandibulares e parótidas para os componentes NH / OH, ácidos graxos, lipídios (CH), amida I, amida II, componente fenil, proteínas glicosiladas, , amilase, cortisol, IgA e proteínas totais (Figura 8 a 11).

• **Submandibular:**

Na glândula submandibular, os grupos NH / OH, ácidos graxos, lipídios, amida I e amida II não tiveram alterações ($P>0,05$) entre controles e DRC. Em contrapartida, o grupamento fenil teve diminuição ($P<0,05$) em animais DRC em comparação com controles, assim como as proteínas glicosiladas (figura 8).

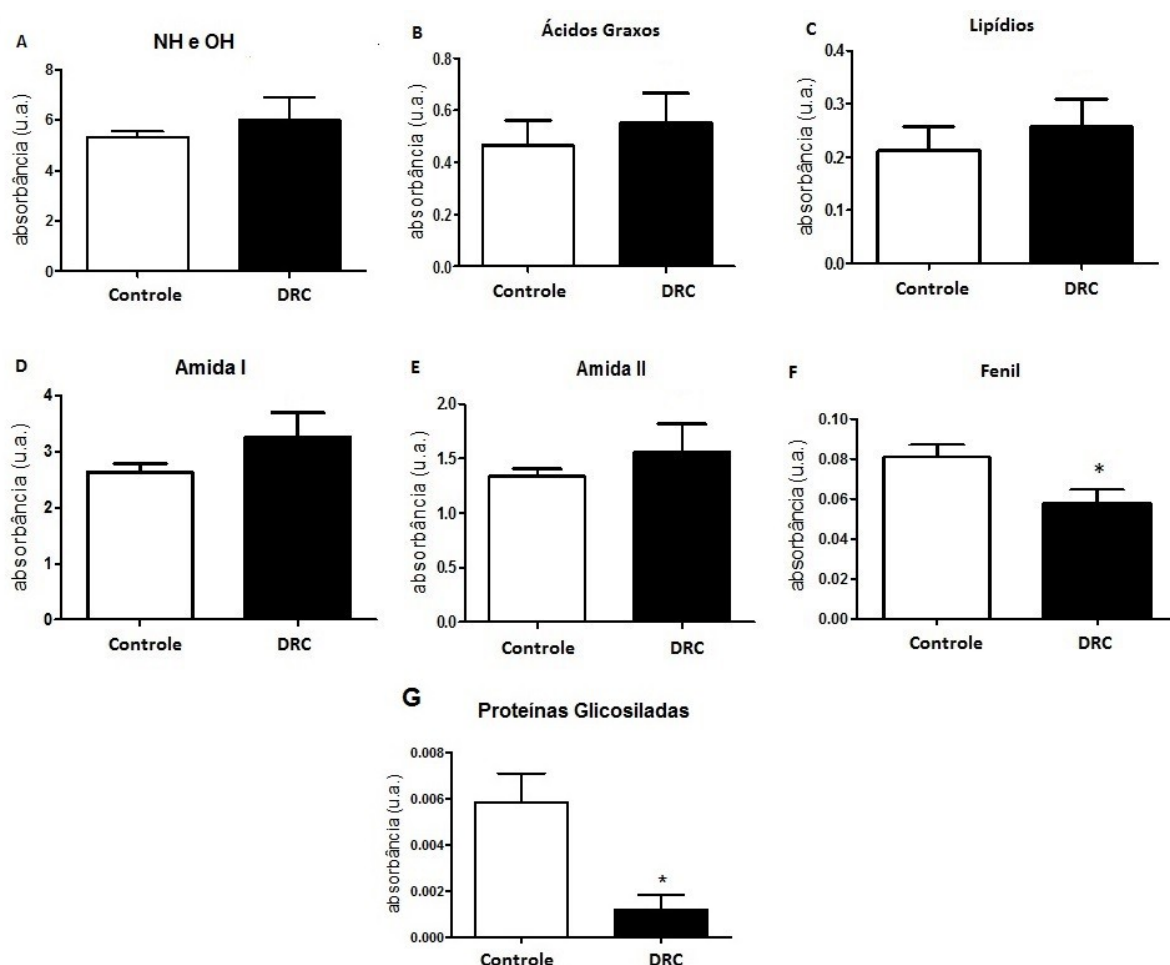


Figura 8: Expressão de componentes químicos em glândula submandibular de animais controles e DRC (45 dias) por meio de FTIR: **A-** NH e OH; **B-** Ácidos Graxos; **C-** Lipídios; **D-** Amida I; **E-** Amida II; **F-** Fenil; **G-** Proteínas glicosiladas. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Teste T Student não pareado. * $P<0,05$ vs Controle.

Com relação à amilase, cortisol, IgA e proteínas totais, na glândula submandibular, também não obtivemos alterações estatísticas ($P>0,05$) comparando animais DRC com controles (Figura 9).

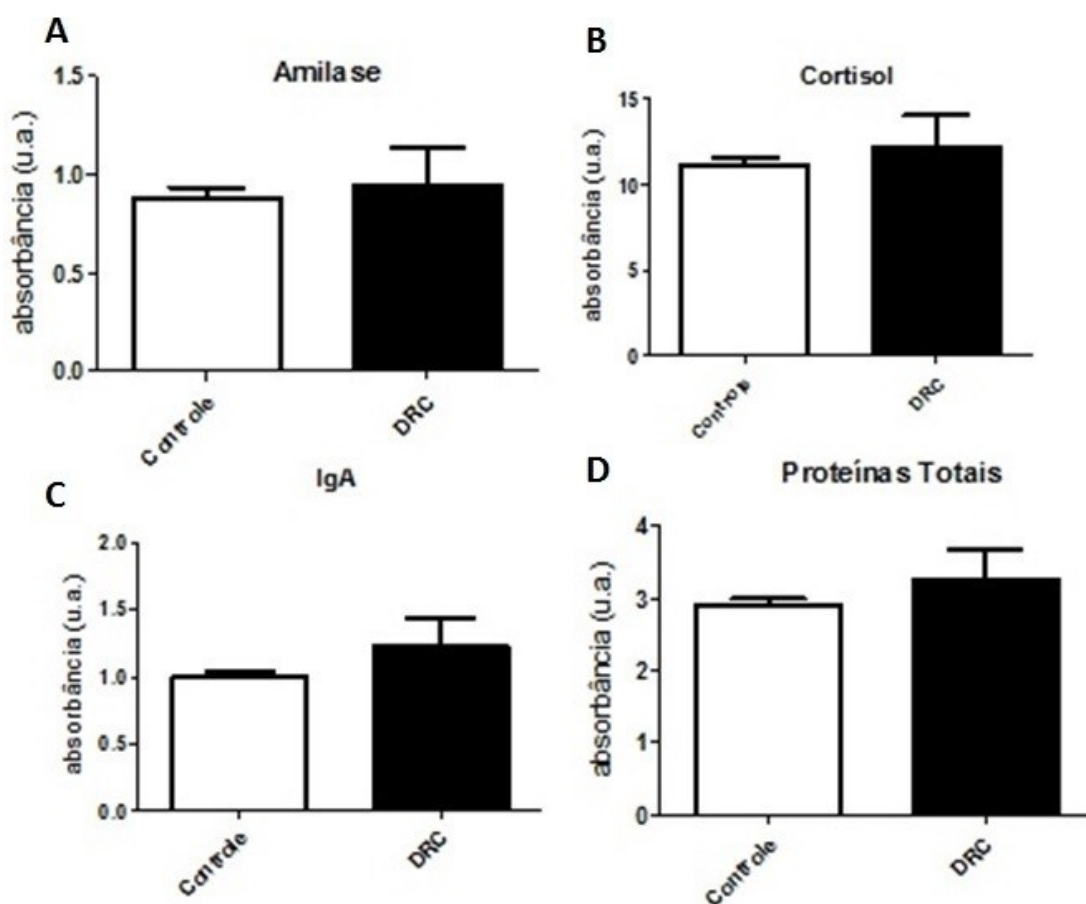


Figura 9: Expressão de proteica e hormonal em glândula submandibular de animais controles e DRC (45 dias) por meio de FTIR: **A-** Amilase, **B-** Cortisol, **C-** IgA e **D-** Proteínas Totais. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Teste T Student não pareado. * $P < 0,05$ vs Controle.

• Parótida:

A DRC promoveu aumento ($P < 0,05$) dos ácidos graxos, lipídios e proteínas glicosiladas na glândula parótida em comparação com controles. Os componentes NH e OH, amidas I e amida II foram diminuídos ($P < 0,05$) em animais DRC em relação aos controles. O componente fenil não sofreu alterações ($P > 0,05$) na parótida de animais DRC em comparação com controles (Figura 10).

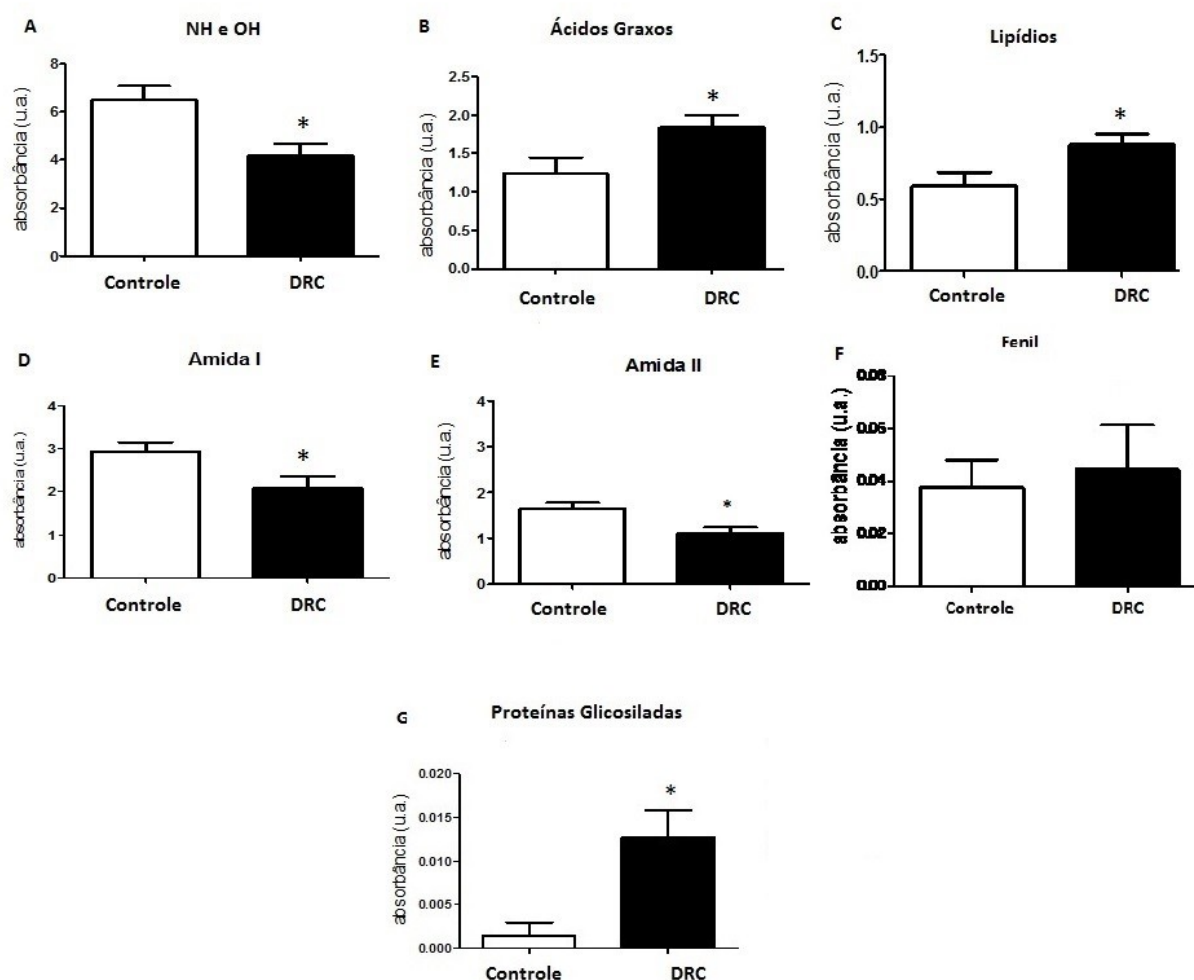


Figura 10: Expressão de componentes químicos em glândula parótida de animais controles e DRC (45 dias) por meio de FTIR: **A-** NH e OH; **B-** Ácidos Graxos; **C-** Lipídios; **D-** Amida I; **E-** Amida II; **F:** Fenil; **G-** Proteínas Glicosiladas. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Teste T Student não pareado. * $P < 0,05$ vs Controle.

Os níveis de amilase, cortisol e proteínas totais nas glândulas parótidas foram semelhantes ($P > 0,05$) entre animais DRC e controle. A DRC promoveu redução ($P < 0,05$) dos níveis de IgA na parótida em comparação aos controles (figura 11).

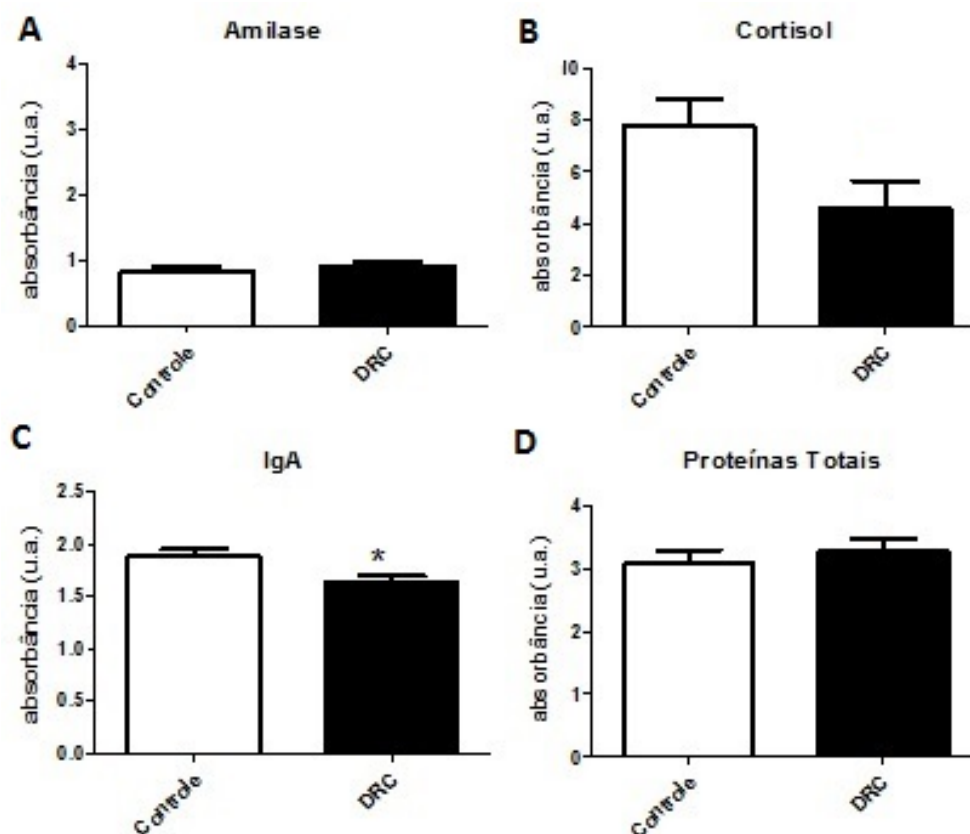


Figura 11: Expressão de proteica e hormonal em glândula parótida de animais controles e DRC (45 dias) por meio de FTIR: **A-** Amilase; **B-** Cortisol; **C-** IgA; **D-** Proteínas Totais. Os valores são expressos em média $\pm$ EPM. Teste T Student não pareado. * $P < 0,05$ vs Controle.

DISCUSSÃO

Sabe-se que a DRC afeta a qualidade de vida de muitas pessoas, porém ainda pouco se sabe sobre os efeitos na cavidade oral dos indivíduos portadores desta patologia. Na prática odontológica comumente iremos nos deparar com pacientes portadores de DRC. Desta forma acreditamos que os achados do presente estudo podem contribuir para o entendimento das alterações promovidas pela DRC em glândulas salivares, o que pode contribuir futuramente para que os cirurgiões-dentistas consigam promover uma redução dos efeitos secundários da doença renal crônica na cavidade oral. Nesse contexto, os principais achados deste estudo foram:

1. A DRC promove alterações mais significativas na composição molecular na glândula parótida em comparação com a submandibular;

2. A manutenção do peso das glândulas salivares após 45 dias do estabelecimento da doença renal é um indicativo de que as vias de apoptose do parênquima glandular não estão significativamente ativadas;
3. O aumento de lipídios e ácidos graxos associados com uma redução em componentes proteicos de amida I e amida II na glândula parótida é um indicativo de que estas alterações estejam envolvidas com a hipofunção salivar na doença renal crônica;
4. A DRC reduziu os níveis de IgA na glândula parótida.

Inicialmente podemos constatar que ocorreu um correto estabelecimento do quadro de insuficiência renal no presente trabalho. O aumento do peso do rim remanescente na nefropatia induzida por nefrectomia 5/6 corrobora outros trabalhos da literatura (Ellis et al., 1977; Tapia, 1999; Gava et al., 2012). Tem sido sugerido que isto se deve ao aumento da microcirculação dos glomérulos renais remanescentes associados com aumento do volume de filtração (Ellis et al., 1977; Tapia, 1999; Gava et al., 2012). As alterações no volume urinário não foram alterados 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.

Outro aspecto relevante que caracteriza o estabelecimento da doença renal é o aumento da concentração de creatinina sérica (Bergamaschi et al., 1997; Romero et al., 1999; Tsuruoka et al., 2002; Ienaga & Yokozawa, 2010) em relação à creatinina urinária, o que está correlacionado com a redução da concentração de creatinina urinária, proteinúria e redução da presença de glomérulos renais (Gava et al., 2012). Como esperado, a redução da excreção de creatinina urinária desencadeia um aumento deste componente no plasma. Em conjunto os dados indicam que o modelo de nefrectomia 5/6 promoveu o desenvolvimento de uremia, aumento da ingestão de fluídos e aumento da concentração de creatinina plasmática, o que confirma a instalação da doença renal crônica.

A conhecimento de alterações precoces da DRC é fundamental 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.

A espectroscopia de infravermelho de transformada de Fourier (FTIR) é um excelente método utilizado para análise de amostras biológicas que possibilitam análise de muitos componentes químicos e proteínas específicas com alta precisão sem requerer reagentes (Khaustova et al., 2010). As interações energéticas dos compostos químicos presentes nas amostras biológicas são estudadas por uma liberação de raios infravermelhos com frequência fixa. Recentemente, estas análises se direcionaram para análise de uma série de tecidos em diversas patologias. Isto ocorre pela sua capacidade de produção de espectros que refletem estados de saúde/doença (Khaustova et al., 2010). Poucos trabalhos têm demonstrado análises detalhadas na doença renal crônica, e este é, pelo nosso conhecimento, o primeiro trabalho que avalia a composição molecular de glândulas salivares com DRC pelo FTIR.

O aumento das alterações promovidas pela DRC na composição molecular da glândula parótida em comparação com a submandibular, é um indicativo de que as alterações secundárias à doença sejam mais efetivas para alterar a função de células serosas (predominantes em parótidas) do que células mucosas (presentes em glândulas submandibulares). Outra hipótese é de que a atividade autonômica para parótidas e submandibulares esteja regulada de forma variável nessas duas glândulas.

Sabe-se que o desenvolvimento do modelo de nefrectomia 5/6 promoveu aumento dos níveis de apoptose nos glomérulos, túbulo renal e interstício renal, o que foi caracterizado pelo aumento na expressão do mRNA e das proteínas caspase-3, -8, -9 (Ienaga & Yokozawa, 2010). Acreditamos que ausência de alteração no peso das glândulas salivares na doença renal crônica é um forte indicativo de que as vias de apoptose do parênquima glandular das parótidas e submandibulares não estão significativamente ativadas.

O aumento de lipídios e ácidos graxos na glândula parótida é um indicativo de que esteja ocorrendo alterações no metabolismo de glicose ou na peroxidação lipídica. No diabetes mellitus, já foi descrito a presença de corpúsculos lipídicos no citoplasma de células acinosas. Estes corpúsculos promovem alterações intracelulares que prejudicam tanto a secreção do componente aquoso da saliva

como a secreção de proteínas salivares, tanto por distúrbios pós-traducionais como na excreção das vesículas intracelulares com proteínas (Nicolau, 2008). A redução dos componentes derivados de peptídeos amida I e amida II na glândula parótida de animais com doença renal pode indicar dois mecanismos biológicos distintos. A primeira hipótese é de que a redução de amidas pode indicar uma ação secundária da DRC na região nuclear que promove a síntese dos mRNAs que serão traduzidos nos ribossomos para a formação de proteínas que serão secretadas no lúmen acinar, bem como, das proteínas da parótida que não secretadas pelo sistema vesicular. Outra hipótese, é que esteja ocorrendo um aumento da secreção de proteínas vesiculares, o que causaria uma redução da detecção de amidas diretamente nas glândulas parótidas. Considerando que também identificamos o aumento da presença de proteínas glicosiladas, acreditamos que a primeira hipótese seja mais provável, pois a presença de glicosilações é um forte indicativo de aumento de estresse oxidativo e redução das funções celulares desempenhadas pelas respectivas proteínas glicosiladas.

Com base no trabalho de Khaustova e colaboradores, avaliamos também a presença de cortisol, IgA, amilase e proteínas totais nas glândulas salivares. Sabe-se que o nível de cortisol sérico e o cortisol salivar é um indicativo da taxa de filtração glomerular (TFG) (Li et al., 2016; Cardoso et al., 2016). Foi também sugerido que o cortisol poderia alterar a função renal diretamente por seus efeitos na função glomerular e tubular. No entanto, o presente trabalho não demonstrou diferença na presença deste hormônio nas glândulas salivares. 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). Acreditamos que a presença similar de cortisol nas glândulas salivares ocorre pela ausência de síntese e de retenção deste hormônio neste território, indicando que as glândulas salivares apenas permitem a passagem do hormônio proveniente do líquido extracelular para o lúmen acinar.

Dois recentes trabalhos da literatura descreveram alterações importantes em glândulas salivares de animais DRC (Romero et al., 2016; Romero, 2017). Sabe-se que a atividade da amilase na saliva estimulada pelas vias simpática e parasimpática

foram reduzidas 8 semanas após a indução da doença renal. Curiosamente, esta atividade foi aumentada 12 semanas após o estabelecimento desta patologia. Acreditamos que a ausência de alteração da amilase nas glândulas salivares, indica que ocorre uma secreção normal desta proteína na saliva de pacientes com DRC. No entanto, a atividade desta enzima deve estar diminuída promovendo uma redução de sua função na digestão de carboidratos. Novos estudos são necessários para descrever se o aumento das glicosilações está presente na amilase, pois isto poderia justificar a redução da função das amilases na saliva de pacientes com DRC. Além disso, também foram descritas redução da atividade da peroxidase e aumento da presença de ureia na saliva de animais com DRC (Romero et al., 2016; Romero, 2017).

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, os níveis de IgA salivar foram semelhantes entre pacientes com DRC em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, durante a hemodiálise, a concentração da IgA foi alterada (Pallos et al., 2015). A redução dos níveis de IgA salivar em ratos DRC (Lasisi et al., 2016) pode ser justificada pela redução de IgA presente na glândula parótida.

CONCLUSÃO

A doença renal crônica promove uma série de alterações nas glândulas salivares dos animais que foram submetidos à nefrectomia 5/6, principalmente as parótidas. Acreditamos que estas alterações podem estar relacionadas à hipossalivação e também as alterações de composição salivar descritas para a DRC.

PRINCIPAIS REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Kader, K., Unruh, M. L. & Weisbord, S. D. Symptom burden, depression, and quality of life in chronic and end-stage kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4, 1057–1064 (2009).
2. Ana Carolina Romero, Cassia Toledo Bergamaschi, Douglas Nesadal de Souza, and Fernando Neves Nogueira. Salivary Alterations in Rats with Experimental Chronic Kidney Disease 2016 Feb; 09
3. 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.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2007 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
5. Davison, S. N. & Jhangri, G. S. Impact of pain and symptom burden on the health-related quality of life of hemodialysis patients. *J. Pain Symptom Manage.* 39, 477–485 (2010).
6. De Rossi SS, Glick M. Dental considerations for the patient with renal disease receiving hemodialysis. *J Am Dent Assoc* 1996 Feb;127(2):211-9
7. DODDS, M. W. J.; JOHNSON, D. A.; YEH, C. K. Health benefits of saliva: review. *Journal of Dentistry.* 33: 223–233, 2005
8. Dynamics of salivary cortisol in chronic kidney disease patients at stages 1 through 4. Estela María del Luján Cardoso, Alejandro Luis Arregger, Dianne Budd, Alfredo Enrique Zucchini, Liliana Noemí Contreras. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2016.
9. Eversole LR. Doenças renais e hipertensão. In: Silverman JR; Eversole LR; Truelove EL. *Fundamentos de Medicina Oral.* Primeira edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004.
10. Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G. ESRD patients in 2004: global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20:2587–93
11. Hanna Abboud, M.D., and William L. Henrich, M.D.. Stage IV Chronic Kidney Disease. *The new england journal of medicine.* 2010;362:56-65

12. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85(2):162-9.
13. Imirzalioglu P, Onay EO, Agca E, Ogus E. Dental erosion in chronic renal failure. *Clin Oral Investig*. 2007;11(2):175-80.
14. Jorge WA, Elias FM, Jorge MD, Tastaldi M, Gonçalves S. Urgências sistêmicas em consultório odontológico. In: Feller C, Gorab R. *Atualização na clínica odontológica: módulos de atualização*. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p. 535-74
15. Kao CH, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Chang HR. Decreased salivary function in patients with end-stage renal disease requiring hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(6):1110-4.
16. Kaufman E, Lamster IB. The diagnostic applications of saliva – A review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13:197–212.
17. 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.
18. Kho HS, Lee SW, Chung SC, Kim YK. Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Sep;88(3):316-9
19. Klassen JT, Krasko BM. The dental health status of dialysis patients. *J Can Dent Assoc*. 2002;68(1):34-8.
20. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med*. 2003;139(2):137-47.
21. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Annals of internal medicine*. 2003;139(2):137–47. Epub 2003/07/16.
22. Martins C, Siqueira WL, Oliveira E, Nicolau J, Primo LG. Dental calculus formation in children and adolescents undergoing hemodialysis. *Pediatr Nephrol*. 2012;27:1961–6.

23. Nandan RK, Sivapathasundharam B, Sivakumar G. Oral manifestations and analysis of salivary and blood urea levels of patients under going haemo dialysis and kidney transplant. *Indian J Dent Res.* 2005;16:77–82.
24. Nezu, A.; Tanimura, A.; Tojyo, Y. Characterization of the Ca^{2+} response mediated by activation of β -Adrenoceptors in rat submandibular ducts. *Jpn J Pharmacol* 84, p. 25-31, 2000.
25. ROMERO, Ana Carolina. **Estudo do efeito da nefropatia crônica experimental induzida pelos 5/6 de nefrectomia nas glândulas salivares de ratos.** 2017. Tese (Doutorado em Materiais Dentários) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23140/tde-04032017-095835/>>. Acesso em: 2017-06-19.
26. 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. Synd*, 2013.
27. Saliva Based Diagnostics – A New Approach in Infancy. [Last cited on 2013 Apr 11].
http://www.share.pdfonline.com/8a4cf69626fd406fa90bfb18b33302b1/manuscript_blind%20review.pdf
28. Salivary Alterations in Rats with Experimental Chronic Kidney Disease. Romero AC, Bergamaschi CT, de Souza DN, Nogueira FN. *PLoS One.* 2016 Feb 9;11(2):e0148742.
29. Seethalakshmi C, Koteeswaran D, Chiranjeevi V. Correlation of Serum and Salivary Biochemical Parameters in end Stage Renal Disease Patients Undergoing Hemodialysis in Pre and Post-Dialysis State. *J Clin Diagn Res.* 2014;8:CC12–4.
30. Seraj B, Ahmadi R, Ramezani N, Mashayekhi A, Ahmadi M. Oro-dental health status and salivary characteristics in children with chronic renal failure. *J Dent (Tehran)* 2011;8:146–51.
31. Sesso RCC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Burdman EA. Censo Brasileiro de Diálise, 2009. *J Bras Nefrol* 2010; 32:380-4.
32. Singh AK, Farag YM, Mittal BV, Subramanian KK, Reddy SR, Acharya VN, et al. Epidemiology and risk factors of chronic kidney disease in India – Results from

- the SEEK (Screening and Early Evaluation of Kidney Disease) study. *BMC Nephrol.* 2013;14:114.
33. Tomas I, Marinho JS, Limeres J, Santos MJ, Araujo L, Diz P. Changes in salivary composition in patients with renal failure. *Arch Oral Biol.* 2008;53(6):528-32.
34. Yong, D. S. et al. Symptom burden and quality of life in end-stage renal disease: a study of 179 patients on dialysis and palliative care. *Palliat. Med.* 23, 111–119 (2009).

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia

**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