

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**POLLIANE MARIA CAVALCANTE DE ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO SALIVAR EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA EM  
RATOS**

**MACEIÓ-AL  
2016**

**POLLIANE MARIA CAVALCANTE DE ARAÚJO**

**AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO SALIVAR EM MODELO DE ASMA ALÉRGICA  
INDUZIDA POR OVALBUMINA EM RATOS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.**

**Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva**

**MACEIÓ-AL**

**2016**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

A658a	<p>Araújo, Polliane Maria Cavalcante de. Avaliação da secreção salivar em modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina em ratos / Polliane Maria Cavalcante de Araújo. – 2016. 61 f. : il.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Robinson Sabino da Silva. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2016.</p> <p style="text-align: center;">Bibliografia: f. 51-61.</p> <p style="text-align: center;">1. Asma. 2. Hipossalivação. 3. Ovalbumina. 4. Xerostomia. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 616.248</p>
-------	--



Universidade Federal de Alagoas  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões  
Av. Lourival Melo Mota, S/N  
Cidade Universitária – Maceió-AL  
CEP: 57072-900  
E-mail: ppgcs9@gmail.com  
Fone: 82 3214 1850

## Folha de Aprovação

Polliane Maria Cavalcante de Araújo

Avaliação da secreção salivar em modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina em ratos

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 26 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (Orientador)

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto – (UFAL)

Prof.ª Dr.ª Priscila Guimarães – (UFAL)

Dedico esta dissertação ao meu pai, Paulo de Araújo (*in memoriam*), cujos ensinamentos, amor, dedicação, força, luta e fé, foram essenciais para me fazer prosseguir neste caminho.

## AGRADECIMENTOS

*À Deus por ter me concedido a dádiva da vida e por ter colocado pessoas tão maravilhosas em minha vida. Por me dar forças para continuar, apesar de todas as dificuldades e provações durante esses dois anos de Mestrado.*

*Aos meus pais, Paulo (in memoriam) e Lúcia, pelo amor incondicional, carinho, apoio, confiança, cuidados, força, por me fazerem acreditar que apesar de todas as dificuldades, nada é impossível quando se tem fé e perseverança, por tudo que fizeram por mim durante todos esses anos da minha vida.*

*Aos meus irmãos, Paula e Paulo, apesar das brigas e chateações sempre estiveram ao meu lado, durante todos os momentos.*

*Ao meu amor, Emerson Cupertino, por todo apoio, companheirismo, conselhos, paciência, por me ajudar a passar por todos os obstáculos da vida, por estar sempre ao meu lado, me fazendo sorrir. Suas palavras de forças, amor, carinho e fé sempre me ajudaram a seguir em frente, muito obrigada por tudo.*

*Às minhas amigas-irmãs, Gabriella e Stheffanny, por todos esses anos de apoio, por estarem do meu lado durante toda essa jornada colégio-universidade, por sempre me darem força, carinho, conselhos e muito amor. Obrigada por se fazerem presentes na minha vida durante mais de uma década de amizade.*

*Ao Professor Dr. Robinson Sabino, pela orientação, oportunidade, pela confiança depositada em mim, pelos conselhos e ensinamentos que foram partilhados que de muito contribuíram para meu crescimento, muito obrigada.*

*Ao Professor Dr. Emiliano Barreto, por todo apoio, incentivo, oportunidades concedidas, pela confiança e por acreditar no meu trabalho.*

*A todos os membros do Laboratório de Biologia Celular, especialmente aqueles que tornam o nosso ambiente de trabalho um segundo lar, minha segunda família: Jordana Rodrigues (amiga, companheira de laboratório/doutorado/leitura), Laís Agra, Janylle Ferro (a chefinha, que tanto me ajudou/ensinou), Návylla Candeia, Tales Lyra, Fernanda Lima,*

*Tácio Cartaxo e Larissa Vieira pela ajuda, apoio, incentivo e momentos de descontração, que foram de imensa valia.*

*A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Celular, meus sinceros agradecimentos.*

*À professora Priscila Guimarães, por todo carinho, ajuda, apoio, conselhos e ensinamentos passados.*

*Ao Laboratório Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa, pelo espaço cedido.*

*Aos professores da Universidade Federal de Alagoas, pelo conhecimento transmitido, por contribuírem imensamente na minha formação de Mestre em Ciências da Saúde.*

*Ao órgão de fomento CAPES, pelo apoio financeiro e suporte científico, que foram de fundamental importância para desenvolver meus trabalhos e para obtenção desta dissertação.*

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças”*

Charles Darwin

## RESUMO

A asma alérgica é uma doença de alta prevalência e morbidade, sendo um grande problema de saúde pública, caracterizada como uma doença crônica das vias aéreas apresentando sintomas variáveis e recorrentes como: limitação do fluxo de ar, hiper-responsividade brônquica e inflamação. A saúde oral em indivíduos com asma, mesmo controlada, é prejudicada, havendo um aumento nos níveis de cáries, dentes cariados, perdidos e obturados (CPOD). Estas desordens na cavidade oral são, provavelmente, causadas pela diminuição da secreção salivar. O uso prolongado de uma gama de fármacos podem desencadear a hipossalivação, um efeito colateral que gera um grande desconforto. Os fármacos usuais para o tratamento da asma, como os corticoides e os agonistas  $\beta$ -2, não revertem a diminuição da secreção salivar nos pacientes asmáticos. O principal fármaco utilizado para o tratamento da hipossalivação é a pilocarpina, porém este fármaco é contra indicada para asmáticos por promover constrição da musculatura lisa das vias aéreas, dificultando ainda mais a respiração de indivíduos asmáticos. Diante destes fatos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a hipossalivação em animais com asma alérgica induzida por ovalbumina. Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob protocolo 03/2014. Foram utilizados ratos Distar (n=6 por grupo) Não-Asmáticos tratados com salina (SAL), Asmáticos tratados com salina (OVA) e Asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). A asma foi induzida através da sensibilização por Ovalbumina e Hidróxido de Alumínio – AL (OH)<sub>3</sub> (50 $\mu$ g+5mg; cada animal recebeu 200 $\mu$ l; s.c.), nos dias 0, 7 e 14. Nos dias 21, 22 e 23, os animais receberam um desafio antigênico por dia, sendo o grupo SAL desafiado com Salina (0.9%), os grupos OVA e OVA+DEXA com Ovalbumina (1mg/ml, sendo colocado 100 $\mu$ l em cada animal; i.n.), sendo este último tratado 1h antes do desafio com dexametasona (2mg/kg; i.p.). Após 48h do último desafio, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg, i.p.) e, em seguida, foi realizada a coleta da saliva não estimulada e estimulada por pilocarpina (2mg/kg; i.p.) e em seguida a coleta do lavado broncoalveolar (BAL) e dissecação da caixa torácica e da região do pescoço para remoção do tecido pulmonar e da glândula submandibular respectivamente. Assim, foram realizados os procedimentos de contagem total e diferencial de células, mensuração do volume salivar, concentração de proteínas totais, análise histológica (HE e PAS). Em outro conjunto de animais, submetidos ao mesmo protocolo de indução da asma alérgica, foram realizadas as análises eletrofisiológicas respiratórias. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM e comparados com ANOVA/Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). O epitélio brônquico de animais asmáticos apresenta um infiltrado inflamatório e aumento na produção de muco o que foi parcialmente revertido pelo tratamento com dexametasona. O volume minuto no período basal foi reduzido nos animais asmáticos em comparação com SAL, o que foi revertido pelo tratamento com dexametasona. Pela primeira vez, foi observado que a indução da asma promove uma diminuição da secreção salivar, tanto estimulada quanto não estimulada com pilocarpina e esta não foi revertida com o tratamento com dexametasona. A concentração de proteínas na saliva mostrou que o grupo OVA+DEXA apresentou uma diminuição de proteínas totais. A glândula submandibular dos animais OVA e OVA+DEXA apresentou um espaçamento no parênquima glandular, o que não foi observado nos SAL. Deste modo, concluiu-se a asma pode promover diminuição da secreção salivar. Além disso, percebeu-se que o tratamento com dexametasona pode melhorar a função respiratória, mas não é eficiente para tratar a hipossalivação.

**Palavras-chaves:** Asma. Hipossalivação. Ovalbumina. Xerostomia

## ABSTRACT

Allergic asthma is a disease with high prevalence and morbidity, and a huge public health problem, characterized as a chronic disease of the airways that is characterized by variable and recurring symptoms such as airflow limitation, bronchial hyperresponsiveness and inflammation. Oral health in individuals with asthma, even controlled, is impaired, with increased levels of caries, teeth decayed, missing and filled (DMF). These disorders in the oral cavity is probably caused by the decrease in salivary secretion. Prolonged use of a range of drugs can trigger hyposalivation, a side effect that generates a discomfort. The drugs useful for the asthma treatment, such as corticosteroids and  $\beta$ -2 agonists do not reverse the decrease in salivary secretion in asthmatic patients. The major drug used for the treatment of hyposalivation is pilocarpine, but this drug is contraindicated for asthmatics for promoting smooth muscle constriction of the airway, making it more difficult to breathing in asthmatic patients. Given these facts, the aim of this study was to evaluate the hyposalivation in animals with allergic asthma induced by ovalbumin. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Alagoas (UFAL) under protocol 03/2014. Wistar rats were used (n=6 per group) non-asthmatic treated with saline (SAL), asthmatic treated with saline (OVA) and asthmatic treated with dexamethasone (OVA+DEXA). Asthma was induced by sensitization to ovalbumin and aluminum hydroxide -  $AL(OH)_3$  (50  $\mu$ g + 5mg, each animal received 200  $\mu$ l; s.c.) on days 0, 7 and 14. On days 21, 22 and 23 the animals received one antigen challenge per day, SAL group was challenged with saline (0.9%) OVA+OVA groups and DEXA with Ovalbumin (1mg/ml, 100  $\mu$ l was placed in each animal; i.n.), the last one was treated 1h before challenge with dexamethasone (2 mg/kg, i.p.). 48h after the last challenge, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.), and then, the unstimulated saliva collection and stimulated by pilocarpine (2mg/kg, ip) was performed and then collecting bronchoalveolar lavage (BAL) and dissection of the chest and the neck to remove the lung tissue and submandibular gland respectively. Thus, the procedures of total and differential count of cells were performed and, measurement of salivary volume, total protein concentration, histological examination (HE and PAS). In another set of animals subjected to the same protocol induction of allergic asthma, were realized the respiratory electrophysiological analyze. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and compared with ANOVA/Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ). The bronchial epithelium of asthmatics animal has an inflammatory infiltrate and an increase in mucus production, which is partially reversed by the treatment with dexamethasone. The minute volume at baseline was reduced in asthmatics compared to SAL animals, which was reversed by treatment with dexamethasone. For the first time, it was observed that the induction of asthma promotes a decrease in salivary secretion, both stimulated and non stimulated with pilocarpine and this was not reversed by treatment with dexamethasone. The protein concentration in saliva showed that DEXA+OVA group showed a decrease in total protein. The submandibular gland of OVA and OVA+DEXA animals showed a gap in the glandular parenchyma, which is not observed in SAL. Thus, it is concluded that, asthma may promote a decrease in salivary secretion. In addition, it is clear that treatment with dexamethasone can improve respiratory function, but it is not efficient to treat hyposalivation.

**Key-words:** Asthma. Hyposalivation. Ovalbumin. Xerostomia.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01	Prevalência mundial da asma alérgica clínica.....	15
FIGURA 02	Prevalência da asma no Brasil.....	15
FIGURA 03	As principais regiões do trato respiratório.....	16
FIGURA 04	Corte histológico de um brônquio.....	17
FIGURA 05	Formação do fluido salivar.....	21
FIGURA 06	Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina.....	28
FIGURA 07	Estrutura histológica do epitélio bronquiolar.....	32
FIGURA 08	Presença de muco no lúmen epitélio bronquiolar.....	33
FIGURA 09	Avaliação do influxo de leucócitos totais no BAL.....	34
FIGURA 10	Contagem diferencial de células inflamatórias no BAL.....	35
FIGURA 11	Análise respiratória – Volume corrente.....	36
FIGURA 12	Análise do volume corrente em função do peso.....	37
FIGURA 13	Análise da frequência respiratória.....	38
FIGURA 14	Análise do volume minuto.....	39
FIGURA 15	Estrutura histológica da glândula submandibular.....	40
FIGURA 16	Deposição de colágeno da glândula submandibular.....	40
FIGURA 17	Quantificação da secreção salivar não estimulada e estimulada por pilocarpina.....	41
FIGURA 18	Concentração de proteínas totais na saliva.....	41

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 01	Possíveis causas dos distúrbios orais em pacientes asmáticos.....	24
-----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>DEXA</b>	Dexametasona
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>GINA</b>	Global Initiative for Asthma
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>OVA</b>	Ovalbumina
<b>PAS</b>	Ácido Periódico de Schiff
<b>SAL</b>	Salina
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>WAO</b>	World Allergy Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
3.1 Asma: Conceito E Epidemiologia.....	14
<b>3.1.1 Sistema Respiratório e Asma.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2 Volumes Pulmonares.....</b>	<b>19</b>
3.2 Sistema Respiratório e Sistema Nervoso Autônomo.....	19
3.3 Saliva.....	20
<b>3.3.1 Formação da Saliva.....</b>	<b>20</b>
<b>3.3.2 Regulação do Fluxo Salivar.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3.3 Funções da Saliva.....</b>	<b>22</b>
3.4 Asma e Distúrbios Orais.....	23
3.5 Asma e Terapêuticas Farmacológicas.....	25
3.5.1 Pilocarpina.....	25
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Animais.....	27
4.2 Modelo experimental de asma alérgica.....	27
4.3 Coleta de saliva não estimulada e estimulada.....	28
4.4 Obtenção do lavado broncoalveolar.....	27
4.5 Coleta de tecido pulmonar e da glândula submandibular.....	29
4.6 Processamento e análise histológica.....	29
4.7 Quantificação de muco no parênquima pulmonar.....	30
4.8 Avaliação da concentração de proteínas totais na saliva.....	30
4.9 Avaliação dos parâmetros eletrofisiológicos.....	31
4.10 Análise estatística.....	31
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1 Estrutura histológica do epitélio bronquiolar.....	32
5.2 Presença de muco no epitélio bronquiolar.....	33
5.3 Parâmetros gerais de caracterização da asma alérgica.....	34

<b>5.3.1 Contagem total de células no lavado broncoalveolar.....</b>	<b>34</b>
<b>5.3.2 Contagem diferencial de células no lavado broncoalveolar.....</b>	<b>34</b>
5.4 Avaliações eletrofisiológicas dos parâmetros respiratórios.....	35
5.5 Estrutura histológica da glândula submandibular.....	40
5.6 Parâmetros salivares.....	40
5.7 Concentração de proteínas totais na saliva.....	41
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A asma é uma doença clinicamente heterogênea e com fisiopatologia complexa (HOLGATE, 2012), que pode ser definida como uma reação de hipersensibilidade do tipo I sendo caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas, com episódios recorrentes de hiper-reatividade brônquica. O estreitamento das vias aéreas obstrui o fluxo aéreo pulmonar, podendo levar o indivíduo à falta de ar, tosse, aumento da pressão torácica e dispneia (AKINBAMI et al., 2012) .

A Organização Mundial de Alergia (WAO), em 2011, divulgou um relatório tratando as doenças alérgicas como uma das prioridades globais para saúde pública. Nos últimos 25 anos a prevalência das doenças alérgicas aumentou muito, afetando cerca de 35% da população mundial. A asma é uma das principais doenças alérgicas e afeta mais de 300 milhões de pessoas no mundo, sendo um problema crescente de saúde pública (PAWANKAR et al., 2011)

Acredita-se que a asma é uma doença heterogênea que possui diferentes fenótipos, no qual, cada um é definido por aspectos clínicos, funcionais, patológicos e biológicos distintos (ANDERSON, 2008). Estes aspectos juntamente com a resposta do paciente ao tratamento contribuem para a caracterização do aumento das escalas de severidade da doença (DOLAN, 2004).

No Brasil, a asma atinge 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos. As mulheres são as mais acometidas pela doença: cerca de 3,9 milhões delas afirmaram ter diagnóstico da enfermidade contra 2,4 milhões de homens, ou seja, prevalência de 39% a mais entre o sexo feminino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). A asma foi a terceira causa de internação hospitalar pelo Sistema Único de Saúde (SUS), com cerca de 300 mil hospitalizações ao ano (BRASIL, 2010). Atualmente, o principal tratamento para a asma consiste basicamente em utilizar glicocorticoides em altas doses por inalação ou por via oral (CORRÊA; MELO; COSTA, 2008). Outra classe de medicamentos para o tratamento são os agonistas  $\beta$ -2 adrenérgicos inalatórios que são necessários para reverter a broncoconstrição e aliviar os sintomas da crise asmática (CAMPO et al., 2013).

Não apenas o tratamento para a asma desencadeia efeitos adversos, mas também a própria doença em si. Uma das manifestações da asma é diminuição da saliva. A saliva é de extrema importância para a saúde oral devido as suas múltiplas funções, nas quais são decorrentes da sua fluidez e de componentes específicos que são secretados na nela (proteínas, íons e glicose) (THAYSEN; THORN; SCHWARTZ, 1954). A diminuição do

fluxo salivar na glândula parótida vem sendo observada em seres humanos asmáticos, após tratamento com agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1990; LENANDER-LUMIKARI, 1998). O uso de terapias convencionais como os corticoides e os agonistas  $\beta$ -2, não solucionam esta hipossalivação (BUSSE; LEMANSKE, 2001).

A pilocarpina é o tratamento mais comum para este problema, porém esta é contraindicada para asmáticos por promover contração da musculatura lisa das vias aéreas (VIVINO et al., 1999) e aumento da secreção de muco (HOLMES, 1999), dificultando ainda mais a respiração em asmáticos.

Pacientes asmáticos também apresentam uma diminuição nas proteínas totais, na amilase, hexosamina, peroxidase salivar, lisozima e IgA secretado da parótida na saliva estimulada (RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1991). E considerando que a saliva apresenta importante função protetora e de preservação da mucosa oral com ação antimicrobiana, conferindo proteção à estrutura dentária (AMEROGEN; VEERMAN, 2002), qualquer fator que possa reduzir qualitativamente e quantitativamente a saliva pode prejudicar a saúde oral (De ALMEIDA et al., 2008).

Considerando que a hipossalivação é frequente em indivíduos asmáticos e que os mecanismos patofisiológicos que desencadeiam esta condição ainda não foram descritos, é essencial o desenvolvimento de modelos experimentais para caracterização de asma para avaliação da secreção salivar para possibilitar o entendimento desta alteração.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a secreção salivar em animais com asma alérgica induzida por ovalbumina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar o padrão respiratório através da espirometria por meio da técnica de Sensor de Fluxo do Espirômetro vinculado ao sistema de eletrofisiologia;
2. Quantificar a saliva não-estimulada;
3. Quantificar o fluxo salivar pelo estímulo da secreção salivar por pilocarpina;
4. Realizar a dosagem total de proteínas presentes na saliva.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASMA: CONCEITO E EPIDEMIOLOGIA

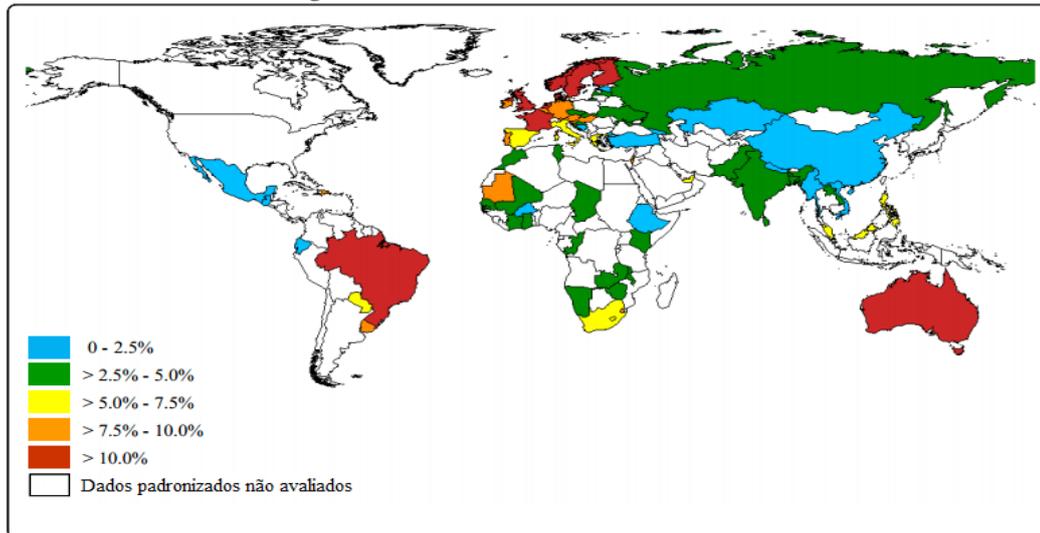
A asma caracteriza-se como uma doença inflamatória das vias aéreas associada à obstrução generalizada, mas variável, do fluxo de ar, sendo reversível espontaneamente ou por meio de intervenção farmacológica (KILEEN; SKORA, 2013). De maneira geral possui episódios recorrentes de dispneia e tosse associada com resposta broncoconstritora exacerbada frente a diversos estímulos, conhecida como hiper-responsividade aérea (Global Initiative for Asthma - GINA, 2005).

Esta doença é caracterizada por diferentes padrões de citocinas que envolve células imunes e/ou inflamatórias como os linfócitos T e B, eosinófilos e neutrófilos. A asma pode ser originada de numerosas interações entre fatores genéticos e agentes ambientais como os alérgenos, vírus respiratórios e poluentes aéreos (BOUZIGON et al., 2008).

A asma é uma reação de hipersensibilidade do tipo I, na qual também é conhecida como imediata, esta reação é mediada pela Imunoglobulina E; o componente primário celular nessa hipersensibilidade é o mastócito ou basófilo. Nesta reação, os anticorpos reagem rapidamente a presença do antígeno (alérgeno); esta reação provoca a ativação dos mastócitos, com liberação da histamina e de outras enzimas vasoativas, provocando vasodilatação e exsudação. Esta reação pode durar de minutos a horas, podendo evoluir para um choque anafilático (ABBAS, 2008).

A asma possui um grande impacto na saúde pública, pois afeta cerca de 315 milhões de pessoas em todo mundo entre adultos e crianças além de afetar a qualidade de vida dos pacientes (TO et al., 2012) e apresentar uma taxa significativa de mortalidade (a cada 250 pacientes asmáticos, ocorre 1 óbito), tornando-se um importante problema de saúde pública mundial (FOLLENWEIDER; LAMBERTINO, 2013).

Os registros de prevalência da asma na população variam de acordo com o país (Figura 01), por exemplo, no Vietnã os registros apontam que a asma afeta 1% da população, enquanto que na Austrália há registros de 21,5% de asmáticos na população (TO et al., 2012).

**Figura 01 - Prevalência mundial de asma clínica**

**Fonte:** Adaptado de TO et al., 2012.

No Brasil, considerando as estatísticas do DATASUS, as complicações decorrentes da asma ocasionaram aproximadamente 660 mil internações no período de janeiro de 2008 a abril de 2011. Deste total de internações, 45,5% foram registrados no nordeste, 21,6% no sudeste, 15% no sul, 9% no norte e 10,2% no centro-oeste. Neste mesmo período, foram gastos cerca de 334 milhões de reais no tratamento desses pacientes. Porém, mesmo com esse montante de recursos despendidos no sistema de saúde, neste mesmo período foram notificados 2.828 óbitos decorrentes da asma (BRASIL, 2010).

Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde relata que a asma atinge aproximadamente 6,4 milhões de brasileiros acima de 18 anos e destaca que há uma maior prevalência nas mulheres, com cerca de 3,9 milhões contra 2,4 milhões de homens, sendo em torno de 39% a mais entre o sexo feminino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

**Figura 2 - Prevalência da asma no Brasil**

**Fonte:** Ministério da Saúde, 2015.

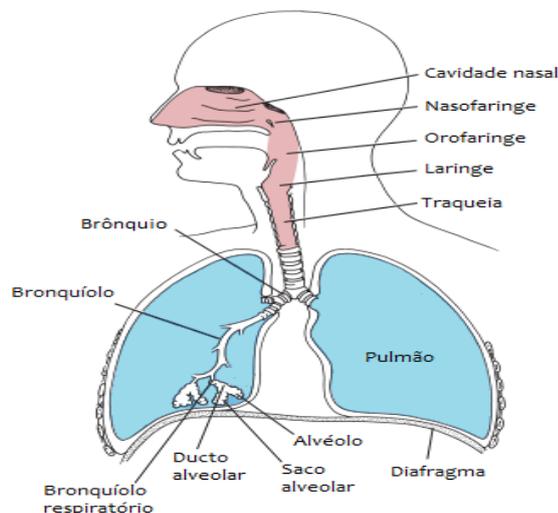
A asma mostra-se como uma doença clinicamente heterogênea e com fisiopatologia complexa por apresentar componentes inflamatórios teciduais e de hiper-reatividade das vias aéreas. A resposta inflamatória possui participação fundamental na fisiopatologia da doença por proporcionar a liberação de mediadores pró-inflamatórios e ativação de células estruturais, bem como o recrutamento leucocitário para as vias aéreas e pulmões (HOLGATE, 2012). A hiper-reatividade das vias aéreas é desencadeada pela contração do tecido muscular situado em sua volta, o que limita a habilidade do indivíduo em mobilizar mais livremente o ar através dos pulmões (KILEEN; SKORA, 2013).

### 3.1.1 Sistema Respiratório e Asma

O aparelho respiratório é dividido em duas partes: condutora e respiratória. A zona da condução começa nas narinas e/ou boca, e inclui cavidades nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos. A segunda parte é onde ocorrem as trocas gasosas e sequencialmente incluem bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos, constituindo o parênquima pulmonar (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013) (Figura 03).

O sistema respiratório possui uma arquitetura voltada para a otimização de sua função primordial que é de efetuar as trocas gasosas. As estruturas que compõem esse sistema podem ser divididas entre aquelas que promovem a entrada e saída de ar do organismo, chamada de zona condutora, e aquelas que facilitam o trânsito gasoso para o sangue e do sangue para o ambiente, chamada de zona respiratória (SALDIVA, 1990).

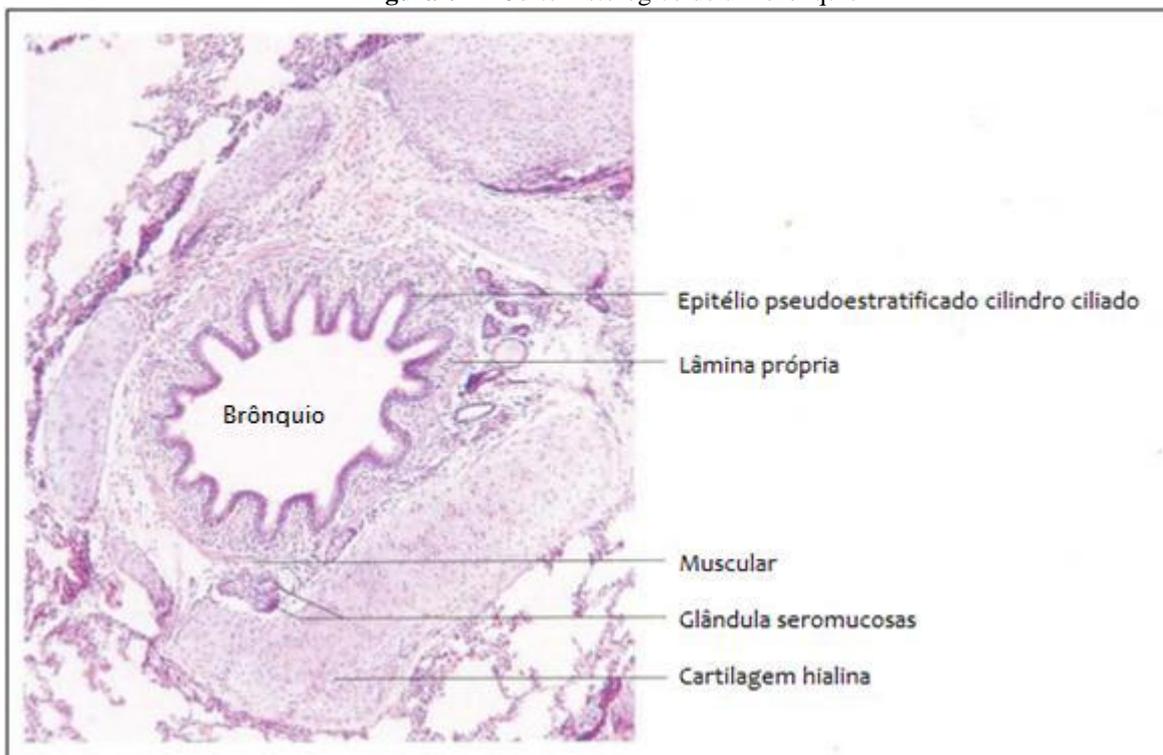
**Figura 03** – As principais regiões do trato respiratório



**FONTE:** Adaptado de ROSS; PAWLINA, 2011.

A traqueia bifurca-se nos brônquios principais direito e esquerdo, cada um subdividindo-se em ramos de 9 a 12 vezes. Cada geração desses ramos mais profundos torna-se sucessivamente mais curta e mais estreita. De dentro para fora, as paredes brônquicas consistem de epitélio respiratório, com menos células caliciformes que na traqueia, sobrejacentes a uma lâmina própria que fica sobre faixas cruzadas de músculo liso, abrangendo a muscular da mucosa. Sob esta há uma camada submucosa com menos glândulas seromucosas que na traqueia, com revestimento de cartilagem hialina e esta é circundada por uma camada adventícia difusa de tecido conectivo fibroso (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013) (Figura 04).

**Figura 04** – Corte histológico de um brônquio



Corte transversal de um brônquio pequeno corado com hematoxilina e eosina (H&E) (aumento de x65).

**FONTE:** Adaptado de GENESER, 1998.

Com a diminuição do tamanho dos brônquios devido as ramificações, as placas cartilagosas tornam-se menores e menos numerosas. As placas cartilagosas finalmente desaparecem quando as vias aéreas atingem o diâmetro de cerca de 1 mm, quando então o ramo é designado bronquíolo (ROSS; PAWLINA, 2011). Define-se bronquíolo como uma via aérea distal desprovida de cartilagem e glândulas submucosas (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013). Em termos funcionais, tais distinções entre os bronquíolos são importantes porque o bronquíolo respiratório representa o início do parênquima pulmonar. A espessura do

epitélio bronquiolar muda do proximal para o distal, passando de um epitélio colunar pseudoestratificado ciliado para um epitélio colunar simples ciliado e então para um epitélio cuboide simples ciliado. Os bronquíolos proximais contêm células caliciformes dispersas, já os bronquíolos terminais e respiratórios não as contêm (MESCHER, 2010). As camadas de músculo liso entrecruzadas da muscular da mucosa, que constituem aspectos proeminentes dos brônquios superiores, também diminuem distalmente, tornando-se quase ausentes nos bronquíolos respiratórios. Os ductos alveolares surgem dos bronquíolos respiratórios distais, e sua parede geralmente parece ser constituída por duas fileiras de aberturas nos alvéolos adjacentes, separadas por pilares de músculo liso e elastina, que funcionam como delgados esfíncteres e mantêm a integridade estrutural (LECHNER; MATUSCHAK; BRINK, 2013).

O parênquima pulmonar dos pacientes asmáticos em geral, permanece pouco alterado em indivíduos que morrem na exacerbação, os chamados *status* asmáticos. Entretanto a composição das mucosas inclui detritos celulares a partir de células epiteliais das vias respiratórias necróticas, células inflamatórias incluindo linfócitos, eosinófilos e neutrófilos, exsudato de proteína plasmática e mucina que é produzida por células caliciformes (KUDO et al., 2013).

O epitélio das vias aéreas de um paciente asmático normalmente mostra descamação das células cilíndricas ciliadas, com células caliciformes e metaplasia de células escamosas, como um sinal de reparação do epitélio das vias aéreas e não apresenta um aumento da espessura da membrana basal sub-epitelial. Este aumento aparente na espessura está relacionado à acumulação de outros componentes da matriz extracelular sob a lâmina basal (ROCHE et al., 1989). O espessamento do epitélio das vias respiratórias é maior nos pacientes asmáticos do que nos indivíduos normais, e em pacientes com estado severo da doença esse espessamento é ainda maior. Esta espessura é devido a um aumento da massa da musculatura lisa das vias aéreas e das glândulas mucosas (JOHNS et al., 2000). A limitação do fluxo aéreo é também agravado pela presença de um aumento da secreção de muco e exsudato inflamatório (CHIAPPARA et al., 2001). Todos esses eventos contribuem para uma obstrução das vias aéreas ocasionando o marco clínico da doença que é caracterizado por episódios recorrentes de crises de tosse, falta de ar, sensação subjetiva de aperto no peito e sibilos (KILLEEN; SKORA, 2013). Assim, estudos têm indicado que o remodelamento das vias aéreas está relacionado à inflamação (KUDO et al., 2013). Apesar destes avanços recentes, mais estudos são necessários para estabelecer uma relação causal entre o remodelamento das vias aéreas e a gravidade da asma.

### 3.1.2 Volumes Pulmonares

Os volumes pulmonares podem ser classificados como volumes estáticos (absolutos) e volumes dinâmicos. Os volumes pulmonares estáticos são os resultantes da complementação de manobras respiratórias, consistindo em compartimentos pulmonares. Os volumes pulmonares dinâmicos são os decorrentes de manobras respiratórias forçadas, expressam variáveis e parâmetros de fluxo aéreo e são medidos através da espirometria. A determinação completa dos volumes pulmonares absolutos (“volumes pulmonares”) constituem-se numa das etapas da avaliação funcional pulmonar, seguindo-se usualmente à espirometria. Considerando que o comportamento mecânico do pulmão é baseado em suas propriedades elásticas e em seu volume, a mensuração dos volumes pulmonares oferece informações que podem ser essenciais para a caracterização do estado fisiopatológico decorrente de anormalidades dos processos pulmonar-ventilatórios. As disfunções restritivas, por exemplo, só podem ser diagnosticada com certeza por meio da medida dos volumes pulmonares. Os volumes pulmonares são convencionalmente divididos em quatro volumes primários. Estes recebem denominações próprias:

**Volume Corrente (VC):** É a quantidade de ar inspirada ou expirada espontaneamente em cada ciclo respiratório, ou seja, a cada respiração normal, também pode ser chamado de volume tidal.

**Frequência Respiratória (FR):** Número de movimentos respiratórios por minuto.

**Volume Minuto (VM):** Quantidade total de ar novo que entra nas vias respiratórias a cada minuto e equivale a  $VC \times FR$ . (BARRETO, 2002; AIRES, 2011)

### 3.2 SISTEMA RESPIRATÓRIO E SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

A inervação do sistema respiratório é basicamente autônoma. Não há inervação motora ou sensitiva para dor nem nas vias aéreas e nem no parênquima pulmonar. Quatro são os componentes do sistema nervoso autônomo (SNA): sistemas parassimpático, simpático, não-adrenérgico não-colinérgico (NANC) inibitório e NANC excitatório. A atividade basal parassimpática parece ser a responsável pelo tônus broncomotor, que é mais importante nas vias aéreas centrais, sendo praticamente inexistente na periferia. As respostas simpáticas são mais difusas e generalizadas. Os nervos adrenérgicos inervam diretamente as glândulas mucosas, vasos sanguíneos e gânglios nervosos das vias aéreas. O sistema NANC foi assim denominado para designar um conjunto de fibras do sistema nervoso autônomo em que os

neurotransmissores da junção neuroefetora não são a noradrenalina ou a acetilcolina. Trata-se de um conjunto heterogêneo e numeroso de fibras nervosas, com um grande número de neurotransmissores já identificados e de função ainda não completamente estabelecida. O sistema NANC inibitório é responsável pelo relaxamento dos músculos lisos das vias aéreas, sendo o neurotransmissor responsável por esse efeito o óxido nítrico. O sistema NANC excitatório tem como mediadores a neurocinina A, substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que acarretam broncoconstrição. O SNA tem um importante papel na regulação e/ou modulação do calibre das vias aéreas, seja em indivíduos normais ou com doenças pulmonares, além de regular o tônus muscular liso, os nervos autônomos podem influenciar: a secreção de muco pelas glândulas submucosas, o transporte de fluido através do epitélio alveolar, a permeabilidade e o fluxo sanguíneo da circulação brônquica e a liberação de mediadores a partir de células inflamatórias (AIRES, 2011).

### 3.3 SALIVA

A saliva é um fluido misto, viscoso, com pH levemente ácido (pH 6-7) contendo água, mucinas, sais orgânicos, proteínas, íons e glicose (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; LÖFGREN et al., 2012). O fluxo médio diário de saliva varia entre 1 e 1,5 litros. A contribuição de cada tipo de glândula pode variar muito de acordo com o estímulo. No estado basal, em humanos, a contribuição das diferentes glândulas no fluxo salivar é de aproximadamente: 65% da submandibular, 20% da parótida, 7% a 8%, da sublingual, e menos de 10% das numerosas glândulas menores (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; GREABU et al., 2009).

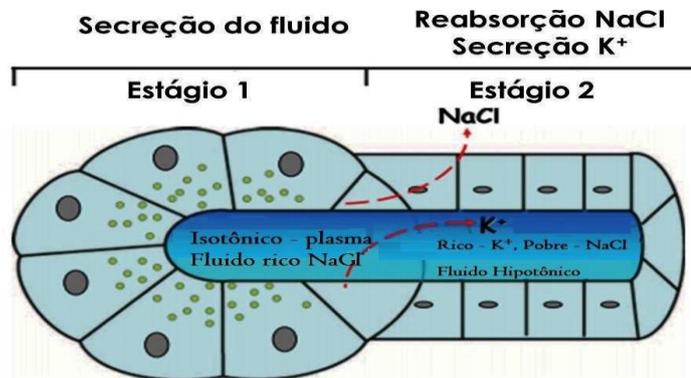
#### 3.3.1 Formação da saliva

A formação da saliva envolve dois estágios (Figura 2). Inicialmente um fluido primário, abundante em íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , isotônico em relação ao plasma, é secretado pelas células acinosas das glândulas salivares no lúmen acinar (estágio 1). Posteriormente, quando o fluido primário passa pelos ductos ocorre reabsorção de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , e secreção de  $\text{K}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  (estágio 2) (THAYSEN; THORN; SCHWARTZ, 1954).

Como a reabsorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  excede a secreção de  $\text{K}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  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 (TURNER; SUGIYA, 2002; MELVIN et al., 2005).

**FIGURA 5** - Formação do fluido salivar.



Fonte: Modelo adaptado de CATALÁN et al., 2009.

### 3.3.2 Regulação do Fluxo salivar

A secreção salivar é um processo controlado por um arco reflexo formado por uma parte aferente e outra eferente. A parte aferente é formada pelos receptores e nervos que conduzem os impulsos, gerados por estímulos da mastigação, gustação e olfação, até o sistema nervoso central. A parte eferente é formada por nervos do sistema nervoso simpático e parassimpático que inervam as glândulas separadamente (GARRETT, 1987). O papel do sistema nervoso simpático e parassimpático na modulação do fluxo e composição da saliva tem sido bastante estudado. O estímulo parassimpático gera uma saliva abundante em volume (GARRETT, 1987; PEDERSEN et al., 2002). Já o estímulo simpático, pela estimulação elétrica das vias eferentes (CARPENTER et al., 1998), ou pela aplicação de agonistas adrenérgicos (VATTA et al., 2002), resulta em uma secreção de baixo fluxo, viscosa e rica em proteínas (GARRETT, 1987).

A parte aquosa da saliva é estimulada principalmente pela interação de agonistas parassimpático (acetilcolina) e simpático (noradrenalina e adrenalina) com receptores muscarínicos tipo 3 ( $M_3$ ) e receptores alfa-1 adrenérgicos ( $\alpha-1$ ), respectivamente. Em ambos os casos, o processo de formação da parte aquosa da saliva é regulado pela concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular pela via do diacilglicerol e inositol-3- fosfato (ZEUTHEN et al., 2000).

### 3.3.3 Funções da Saliva

A importância da saliva para a saúde oral é bem conhecida e suas múltiplas funções ocorrem pela sua fluidez e por componentes específicos. Na cavidade oral a saliva desempenha diversas funções: digestiva, antibacteriana, de tamponamento, lubrificante e também está envolvida na manutenção da integridade dos dentes (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Além de possuir um importante papel de proteção imunológica contra patógenos bucais, bem como atuar mecânica e quimicamente no controle da formação do biofilme, a saliva contribui para a manutenção fisiológica dos tecidos bucais (ERSIN et al., 2006).

O fluido salivar umedece o alimento e auxilia na mastigação e formação do bolo alimentar. Glicoproteínas mucosas, incluindo as mucinas salivares e glicoproteínas ricas em prolina, aumentam a lubrificação para o bolo alimentar e facilitam a deglutição. Neste fluido também estão presentes enzimas, incluindo  $\alpha$ -amilases, proteases, lipases e glico-hidrolases, que iniciam a digestão parcial de componentes alimentares (AMANO et al., 2012; RUHL, 2012).

A saliva também exerce importante ação defensiva contra danos promovidos por: ataques mecânicos, químicos e infecciosos, garantindo proteção contra numerosas bactérias orais e fungos, por meio de uma atividade antimicrobiana local exercida por enzimas, imunoglobulinas, lisozima, lactoperoxidase e histaminas (APS; MARTENS, 2005; ZALEWSKA et al., 2011). Esse fluido desempenha papel fundamental na manutenção da limpeza dos dentes através da remoção de detritos, o que pode ser reforçado pela atividade de enzimas proteolíticas e glicolíticas. Através de um sistema de tamponamento, a saliva é capaz de neutralizar substâncias ácidas. Em adição, mantém a integridade do dente, facilitando os processos de desmineralização e remineralização (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; RUHL, 2012).

### 3.4 ASMA E DISTÚRBIOS ORAIS

Indivíduos asmáticos, na sua maioria crianças, apresentam um maior risco de desenvolverem doenças orais comparados com os indivíduos não asmáticos. Ainda não está estabelecido se este incremento da presença e severidade das doenças orais está relacionado à doença ou a efeitos adversos da farmacoterapia utilizada para seu controle (ATTRILL; HOBSON, 1984; RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1991; ARNUP; LUNDIN; DAHLLÖF,

1993; MILANO, 1999).

Em 1987, Ryberg e colaboradores sugeriram que o aumento na prevalência de cáries está associada ao uso prolongado de agonistas  $\beta$ -2, que levam a uma diminuição do fluxo salivar e de pH, reduzindo ou modificando os efeitos protetores da saliva. Outro estudo relatou que crianças e adolescentes asmáticos apresentam uma diminuição do fluxo salivar e esta redução tem relação direta com a severidade da doença, sendo assim, quanto maior a severidade da asma, menor o fluxo salivar (PAGANINI et al., 2011).

A diminuição do fluxo salivar também já foi relatada em adultos asmáticos (LENANDER-LUMIKARI et al., 1998). Foi demonstrado na literatura que pacientes asmáticos apresentaram maior incidência de cáries, doenças periodontais, diminuição do fluxo salivar bem como aumento de lesões na cavidade oral (LAURIKAINEN; KUUSISTO, 1998). Um estudo relatou que o tratamento de pacientes asmáticos com agonistas  $\beta$ -2 de longa duração e corticoides, ambos administrados por via inalatória, causam uma diminuição no fluxo salivar e um aumento no aparecimento da placa dentária. Estes estudos sugerem que o aparecimento de cáries e placas é devido pelo menos em parte a diminuição do fluxo salivar e da IgA secretada (Tabela 01) (SAG et al., 2007).

Acredita-se que as medicações inalatórias utilizadas para o tratamento da asma podem deixar o indivíduo vulnerável ao aparecimento de cáries, já que estes medicamentos deixam cavidade oral ressecada, o que predispõe também ao aparecimento de fungos e pode prejudicar a cicatrização da mucosa (AGUILERA et al., 2005).

**QUADRO 1:** Possíveis causas dos distúrbios orais em pacientes asmáticos.

<b>Condição da Saúde Oral</b>	<b>Possíveis causas</b>
Cáries Dentais	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição do fluxo salivar causado por agonistas <math>\beta</math>-2</li> <li>• Aumento no número de <i>Lactobacilli</i> e <i>Streptococcus mutans</i></li> <li>• Diminuição do pH salivar devido ao uso de inaladores</li> <li>• Fermentação de carboidratos presentes nas medicações anti-asma</li> <li>• Aumento na frequência de consumo de bebidas cariogênicas</li> <li>• Redução da capacidade de a saliva atuar como tampão e do fluxo salivar devido o uso de agonistas <math>\beta</math>-2</li> </ul>
Erosão Dental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento da exposição dos dentes à ácidos</li> <li>✓ Fonte extrínseca – Refrigerantes ácidos – Acidez da medicação</li> <li>✓ Fonte intrínseca – Refluxo gastro-esofágico</li> </ul>
Doença Periodontal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da proteção salivar devido a redução do fluxo e da IgA secretada</li> <li>• Desidratação da mucosa alveolar devido à respiração bucal</li> <li>• Alteração da resposta imune e aumento da concentração de IgE no tecido gengival</li> <li>• Aumento da incidência de cálculo devido ao aumento dos níveis de cálcio e fósforo na saliva</li> <li>• Diminuição da densidade mineral óssea associada à corticoides inalatórios</li> </ul>
Candidíase Oral	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imunossupressão generalizada e efeitos anti-inflamatórios de esteroides</li> <li>• Aumento da concentração de glicose na saliva que pode promover o crescimento e proliferação de <i>Candida</i></li> <li>• Baixo fluxo salivar</li> </ul>

**Fonte:** Adaptado de THOMAS et al., 2010.

Indivíduos asmáticos apresentam uma diminuição na concentração de proteínas totais, amilase, hexosamina, bem como na peroxidase salivar, em lisozimas e na IgA secretada (RYBERG; MÖLLER; ERICSON, 1991; ERSIN et al., 2006). Acredita-se que isto pode estar relacionado ao maior índice de complicações orais, devido a alterações na composição da saliva, afetando sua capacidade protetora da mucosa.

Diversos trabalhos clínicos e experimentais demonstraram que a hipossalivação causa complicações orais que incluem: xerostomia (queixa subjetiva de boca seca); aumento de incidência e severidade das cáries, doença periodontal, candidíase, redução da cicatrização, lesões teciduais na língua e mucosa oral e úlceras esofágicas, o que reduz a qualidade de vida dos pacientes (SABINO-SILVA et al., 2009; ASPEN et al., 2012; KOCZOR-ROZMUS et al., 2003). Portanto, existe a necessidade urgente de descobrir os mecanismos funcionais e moleculares que promovem estas alterações do fluxo salivar. Considerando que o aumento da secreção salivar é dependente de um aumento da perfusão de glândulas salivares, entendemos

que este é um parâmetro que deve ser analisado mesmo que ainda tenha sido pouco utilizado na literatura.

### 3.5 ASMA E TERAPÊUTICAS FARMACOLÓGICAS

Embora a asma seja considerada uma doença com obstrução reversível das vias aéreas, um subgrupo de pacientes desenvolve uma obstrução persistente irreversível e progressiva. Esses pacientes recebem altas doses de corticosteroides inalados durante a fase estável da doença por no mínimo 4 semanas. Os corticoides são os medicamentos mais potentes e consistentemente eficazes para alcançar os objetivos do tratamento, como por exemplo, beclometasona e budesonida. Estes medicamentos são, por conseguinte, a terapia indicada para os pacientes com asma persistente, incluindo aqueles que têm asma geralmente bem controlada (BEL, 2013). Entretanto, a utilização de altas doses ou utilização por longo período de tempo podem causar efeitos adversos sistêmicos resultando em retardo do crescimento em crianças, osteoporose e distúrbios metabólicos (BARNES, 2006).

Outra classe de medicamentos de ação rápida são os  $\beta_2$ -agonistas inalatórios, como o salmeterol e o formoterol, que são necessários para reverter a broncoconstrição e aliviar os sintomas da crise asmática (CAMPO et al., 2013). Apesar das vantagens associadas ao uso desta classe de medicamentos, ensaios clínicos randomizados têm sugerido que os broncodilatadores de ação prolongada podem ser relacionados com um aumento do risco de exacerbações graves de asma e mortes relacionadas à asma (BEL, 2013).

Estas terapias convencionais para o tratamento da asma não revertem os problemas causados na cavidade oral, alguns destes medicamentos são apontados como causadores de distúrbios na cavidade oral pela diminuição da secreção salivar, fato muito relatado por pacientes asmáticos como uma sensação de boca seca (xerostomia).

#### 3.5.1 Pilocarpina

A pilocarpina é um antagonista muscarínico e os receptores muscarínicos têm função importante na secreção de líquido, resultando em grande volume de saliva secretada com baixa concentração de proteína (GARRET, 1987). A pilocarpina, inicialmente extraída da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi*, produz seus efeitos pela interação com receptores muscarínicos em glândulas exócrinas (tais como glândulas salivares) e em músculo liso,

proporcionando aumento do tônus muscular no sistema gastrointestinal, geniturinário, olhos e trato respiratório. (FERGUSSON, 1993; HAMLAR et al., 1996).

Por ser um medicamento que se liga aos receptores muscarínicos de forma não seletiva, a pilocarpina promove uma grande quantidade de efeitos adversos, que parecem ser dose-dependentes (HOLMES, 1999). A administração de pilocarpina produz uma resposta inesperada como o aumento da pressão arterial, o que está associado ao aumento da resistência vascular mesentérica, além de outros efeitos adversos, tais como a vasodilatação de glândulas salivares e a manutenção de parâmetros na resistência vascular da musculatura esquelética ou na frequência cardíaca, bem como rubor facial, sudorese excessiva, náuseas, vômitos, distúrbios gastrointestinais, cefaleia, aumento da frequência urinária e contração da musculatura lisa (VIVINO et al., 1999; TAKAKURA et al., 2005; TAYLOR; ALHASHIMI, 1996).

Sabe-se que a pilocarpina é bastante utilizada para o tratamento de condições que promovem redução da secreção salivar. Entre as principais patologias que promovem redução da secreção salivar estão a Síndrome de Sjögren, o diabetes mellitus, a hipertensão arterial, a síndrome metabólica e a asma brônquica. Além disso, sabe-se que diversos fármacos disponíveis no mercado também produzem intensa redução da secreção salivar: anti-histamínicos, betabloqueadores, anticolinérgicos, anti-hipertensivos, antidepressivos, antagonistas de receptores alfa e beta adrenérgicos e corticoides (WISEMAN; FAULDS, 1995; FIELD et al., 1997; TORRES et al., 2002).

Além disto, podem haver interações medicamentosas entre a pilocarpina e diversos fármacos, principalmente os agonistas  $\beta$ -adrenérgicos e outros parassimpaticomiméticos (GRISUS, 2001). Estudos relatam que pequenas doses de pilocarpina injetadas intraperitonealmente induzem uma resposta pressora de longa duração (MOREIRA et al., 2003; TAKAKURA et al., 2005).

A pilocarpina é contraindicada em pacientes asmáticos devido a sua ação de constrição da musculatura lisa das vias aéreas. No entanto, sabe-se que indivíduos asmáticos sem tratamento e aqueles que recebem a terapia convencional com corticoides e agonistas beta-adrenérgicos continuam apresentando redução da secreção salivar e danos severos em sua saúde oral (HAMLAR et al., 1996; PAGANINI et al., 2011).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob protocolo de número 03/2014.

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando 200-250g, com 2 meses de idade, obtidos junto ao Biotério Central da UFAL. Os animais foram acondicionados no biotério do Laboratório de Biologia Celular (LBC) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) nas seguintes condições: a) ciclo claro/escuro de 12 horas; b) temperatura ambiente  $23 \pm 2$  °C; c) oferta plena de água e ração para roedores.

Os animais foram separados nos seguintes grupos experimentais (n = 6/grupo):

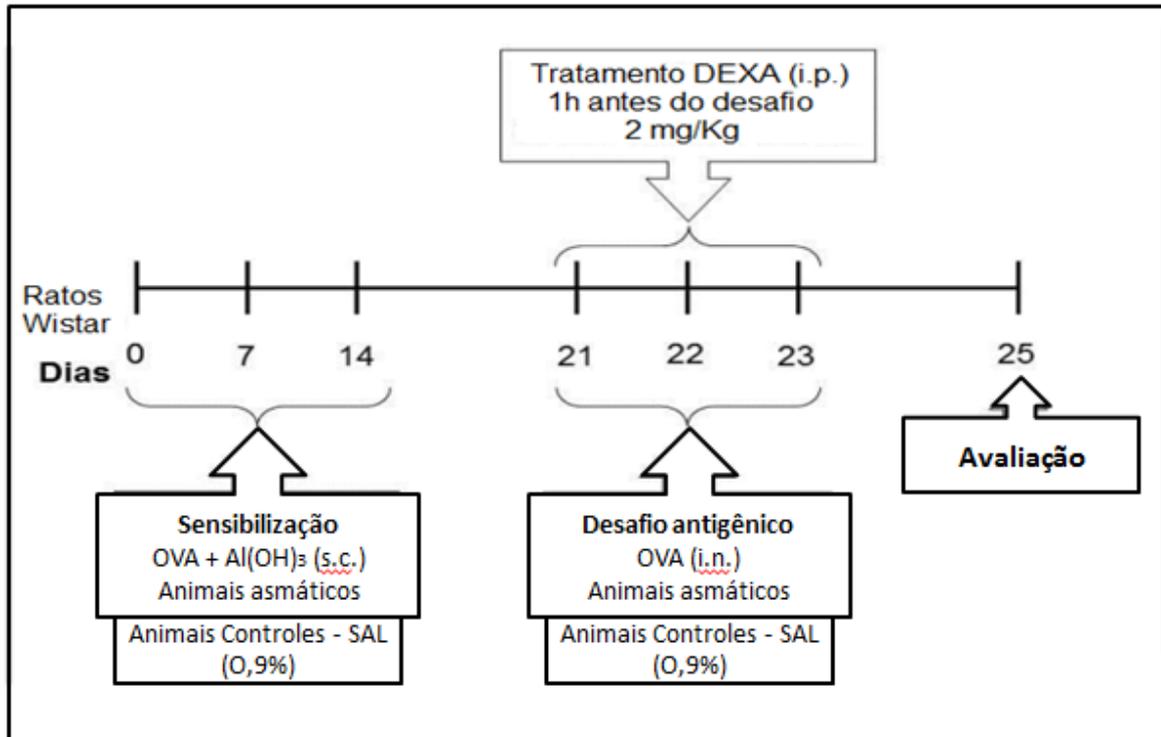
- a) **Não-asmáticos tratados com salina (SAL):** ratos sensibilizados com veículo e tratados com veículo (salina estéril 0,9%);
- b) **Asmáticos tratados com salina (OVA):** ratos sensibilizados com ovalbumina e tratados com veículo (salina estéril 0,9%);
- c) **Asmáticos tratados com Dexametasona (OVA+DEXA):** ratos sensibilizados com ovalbumina e tratados com dexametasona;

### 4.2 MODELO EXPERIMENTAL DE ASMA ALÉRGICA

Todos os animais receberam imunização sistêmica por meio de administração subcutânea (s.c.) de ovalbumina (OVA) (50 µg/animal) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) e hidróxido de alumínio (Al(OH)<sub>3</sub>) (5 mg/animal) (Alfa Aesar) diluído em solução de TRIS 0,01M; HCl 1N e 2,9 g NaCl com volume final de 200 µl nos dias 0, 7 e 14 (CONRAD et al., 2009). Nos dias 21, 22 e 23, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p) de xilazina (12 mg/kg) (Ceva) e cetamina (80 mg/kg) (Ceva) para a realização dos desafios antigênicos através da administração intranasal (i.n) de OVA (25 µg/25 µl) nos animais asmáticos. Os animais controles foram desafiados com o mesmo

volume de solução salina (veículo). Os animais do grupo DEXA receberam tratamento com dexametasona (2 mg/kg; i.p.) (Farmace), 60 min. antes de cada desafio antigênico (Figura 05).

**Figura 06** – Esquema ilustrativo do modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina e tratamento com dexametasona



**FONTE:** Elaborado pelo autor.

SAL: salina. OVA: ovalbumina; Al (OH)<sub>3</sub>: hidróxido de alumínio.

#### 4.3 COLETA DA SALIVA NÃO ESTIMULADA E ESTIMULADA

No 25º dia após anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg; i.p.), os animais foram submetidos a coleta da saliva não estimulada pelo método do algodão, no qual quatro pequenas esferas de algodão foram inseridas na cavidade oral do animal e permaneceram por 10 min. A quantificação do volume foi feita através da relação peso seco/peso úmido de eppendorfs previamente pesados com as esferas de algodão secas e posteriormente com as esferas úmidas no qual cada 1 mg foi considerado 1 µL (Sabino-Silva et al., 2009; Sabino-Silva et al., 2013). Logo após a retirada das esferas foi administrado nos animais pilocarpina (2 mg/kg; i.p.), droga utilizada para estimular a secreção salivar, e a saliva estimulada foi coletada por 10 min, os quais foram contados a partir do momento que o animal iniciou a salivação (Saad et al., 2003).

#### 4.4 OBTENÇÃO DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

Após o período de 48 horas do último desafio antigênico, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg; i.p.) e foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL) através da exposição da traqueia e inserção de uma cânula de polietileno conectada a uma seringa de 1 mL. O pulmão foi lavado duas vezes com PBS (*Phosphate Saline Buffer*) obtendo um volume final de 1 mL e o líquido recolhido foi centrifugado a 1500 rpm (rotações por minuto) por 10 minutos a 5 °C. O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e armazenado em freezer de ultrabaixa temperatura -80 °C. As células concentradas no tubo foram ressuspensas em PBS e diluídas na solução de Turk (1:100) para a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer por microscopia óptica (x20) (BX4, OLYMPUS). Uma amostra de 100 µl dessas células foi utilizada para o preparo de citoesfregaços e as lâminas foram posteriormente coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa para a contagem diferencial das células baseado nos critérios normais de morfologia, classificando-as como eosinófilos, neutrófilos ou mononucleares com o auxílio um microscópio óptico com a objetiva de x100.

#### 4.5 COLETA DE TECIDO PULMONAR E DA GLÂNDULA SALIVAR

Assim que o BAL foi coletado, a perfusão pulmonar foi iniciada, por meio de uma cânula introduzida na artéria pulmonar, para administração de salina fisiológica tamponada (salina EDTA, pH 7,4; 0,01M) a partir de um reservatório 25 cm acima do coração do animal que garantia uma pressão fisiológica de perfusão (MONTEIRO et al., 2004). No mesmo momento, uma incisão foi realizada no ventrículo esquerdo do coração para evasão do sangue e, conseqüente, limpeza do órgão. Este procedimento provocou a eutanásia do animal por exsanguinação. Depois que a superfície dos pulmões tornou-se branca, o mesmo foi removido e armazenado em solução neutra tamponada de formol a 10% para fixação durante 24 horas. Após a coleta dos pulmões, a região do pescoço foi exposta e as glândulas submandibulares foram retiradas e também fixadas.

#### 4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a fixação do pulmão em solução neutra tamponada de formol a 10%, o mesmo foi desidratado por diferentes concentrações de etanol, clarificado por xilol, e incluído em parafina. Em seguida, o material parafinado foi levado ao micrótomo (Leica RM2125) para a realização de cortes de 5  $\mu\text{m}$ . Logo após, os cortes foram desparafinados com xilol, reidratados por concentrações decrescentes de etanol e submetidos a colorações para avaliação estrutural (Hematoxilina-Eosina - HE), produção de muco (Ácido Periódico de Schiff - PAS). A análise foi realizada por microscopia de luz convencional. O mesmo procedimento de inclusão em parafina foi realizado com a glândula submandibular, porém foram realizadas as colorações de Hematoxilina-Eosina e Tricômio de Masson (para observar a deposição de colágeno).

A combinação mais tradicional de corantes usada em histologia é a HE, pois distingue os diversos componentes estruturais celulares da matriz extracelular. A hematoxilina possui característica química alcalina, ou seja, tem atração por elementos ácidos que compõem os tecidos (acidófila), tais como as proteínas, o retículo endoplasmático rugoso e os ácidos nucleicos, conferindo a essas estruturas a cor azul-púrpura. Já a eosina, por ser um corante com característica ácida (basófila), apresenta afinidade predominante pelo citoplasma, corando-o de róseo a vermelho. A coloração PAS é frequentemente usada para identificar glicogênio nos tecidos. A reação do PAS oxida seletivamente os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o Reagente de Schiff e produz uma cor rosa-magenta. Assim, é usada para corar estruturas que contêm uma alta proporção de macromoléculas de carboidratos (glicogênio, glicoproteína e proteoglicanos), tipicamente encontradas no muco (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011).

##### 4.6.1 Quantificação de muco no parênquima pulmonar

Para avaliar os níveis da produção de muco no pulmão, fotomicrografias de 10 campos aleatórios por lâmina foram realizadas usando câmera digital (DP25, OLYMPUS) adaptada ao microscópio (40x) (BX41 OLYMPUS). A análise quantitativa das imagens foi realizada através do programa ImageJ® 1.47 (*National Institutes of Health* (NIH) - EUA). Por meio deste programa foi realizada a determinação do percentual de produção de muco através do reconhecimento da cor relativa às estruturas de interesse (muco) e cálculo da densidade de área, que foi definida pelo

quociente entre área ocupada pela quantidade de muco produzido pelas células epiteliais brônquicas e a área total do campo analisado.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DA SALIVA

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por BRADFORD (BRADFORD, 1976), utilizando o Reagente de Bradford (Sigma Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). A reação é baseada na formação de complexos entre o corante de Coomassie Brilliant Blue com a cadeia polipeptídica. Uma alíquota de 2  $\mu$ L de cada amostra foi agrupada em placa de 96 poços, assim, nos quais foram adicionados 196  $\mu$ L de Reagente de Bradford. Uma curva padrão foi montada com albumina sérica bovina (1 mg/mL). Após a disposição das amostras, a absorbância foi obtida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS

Em outro conjunto de animais, foi realizado todo processo de sensibilização e desafio antigênico e 48 horas após o último desafio os animais foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg) e submetidos a análises eletrofisiológicas, de parâmetros respiratórios.

Para análise dos parâmetros respiratórios, foi realizado um acesso à traqueia para inserir uma cânula de polietileno que fez a manutenção prévia das vias aéreas e em seguida, esta cânula foi ligada a um cabeçal conectado ao sensor do espirômetro para avaliação da função pulmonar. Este processo avalia a função pulmonar através do volume corrente que dará a frequência respiratória. Os dados são descritos em volts e convertidos em mililitros (10 v – 1 ml).

O registro basal foi realizado durante os primeiros 10 minutos e então a pilocarpina (2 mg/kg; i.p.) foi administrada e foi realizado 20 minutos de registro. Todos os dados obtidos foram enviados para o Power Lab 4/30 Stimulator (ADInstruments) e por meio do programa LabChart foram obtidos os registros dos parâmetros.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Estes foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-

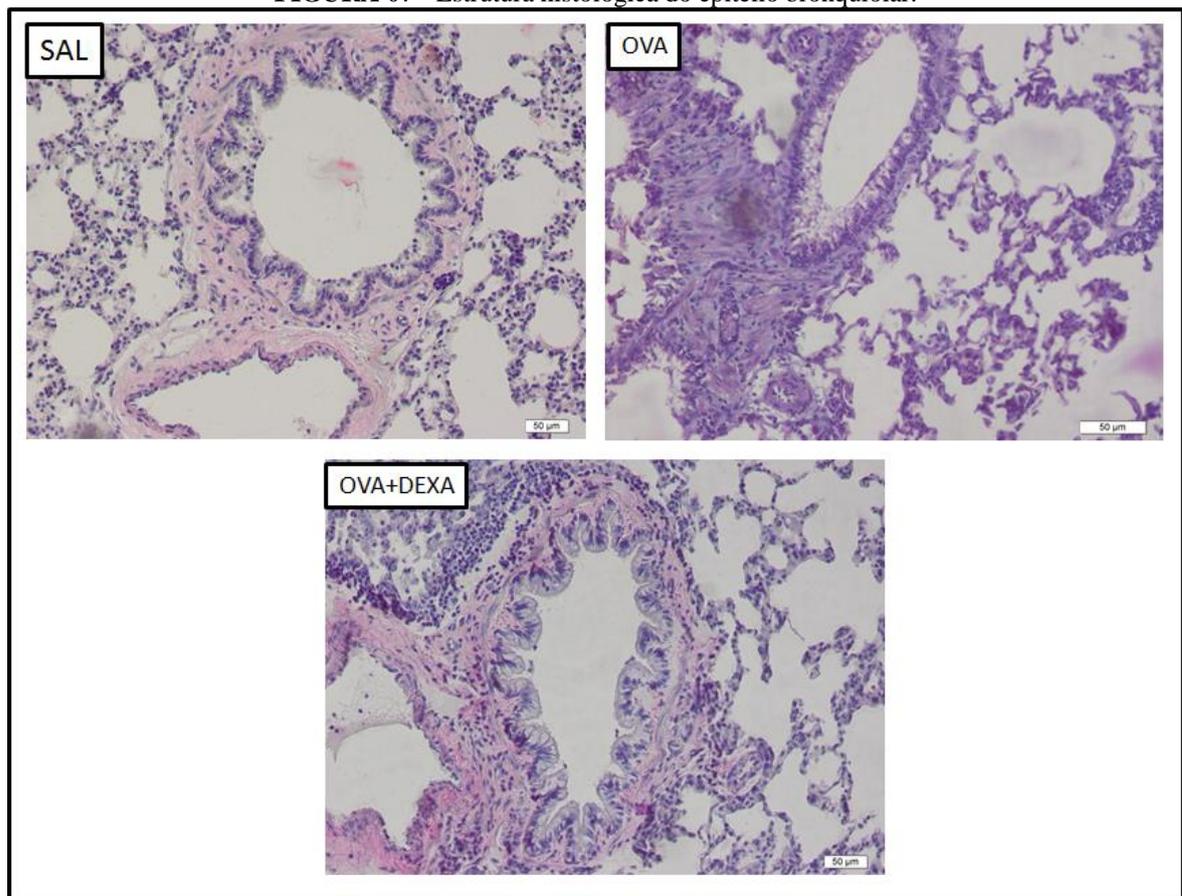
teste Student-Newman-Keuls. Essas análises foram feitas com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism (GraphPad, versão 5.0, USA). O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de  $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DO EPITÉLIO BRONQUIOLAR

Após a coloração de H.E. (Hematoxilina-Eosina) observou-se que os pulmões dos animais que não sofreram estímulo alérgico apresentaram uma estrutura tecidual livre de células inflamatórias na região peribrônquica, já os animais previamente sensibilizados e estimulados com OVA desenvolveram mudanças morfológicas, como a presença de infiltrado celular inflamatório rico em eosinófilos em áreas perivasculares e peribrônquicas quando comparado com os pulmões dos animais controle (SAL). Os animais OVA+DEXA também apresenta uma presença de infiltrado inflamatório, porém com menor intensidade do que o observado nos animais OVA.(Figura 07).

**FIGURA 07** - Estrutura histológica do epitélio bronquiolar.

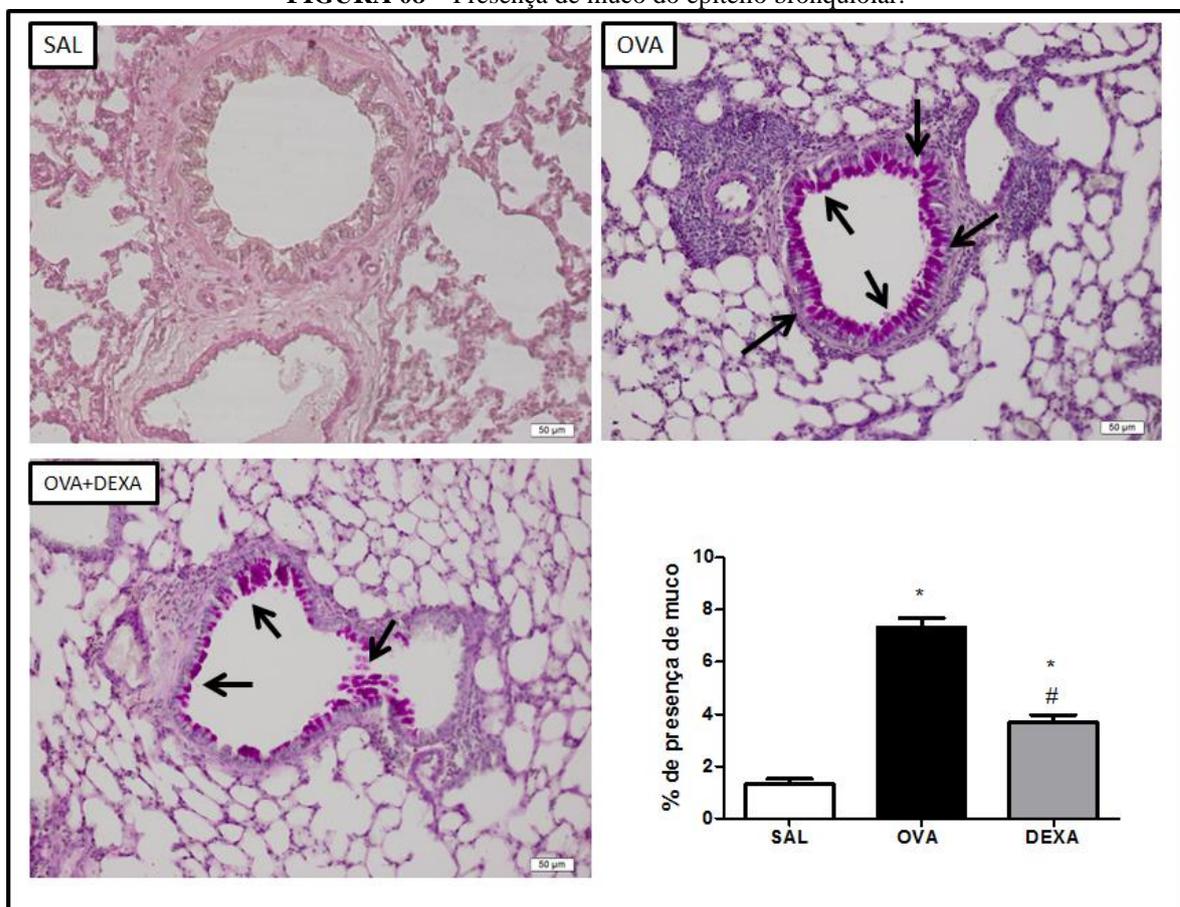


Fotomicrografias da estrutura do epitélio bronquiolar coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Aumento: 20x.

## 5.2 PRESENÇA DE MUCO NO LÚMEN DO EPITÉLIO BRONQUIOLAR

As fotomicrografias apresentadas na Figura 08 mostram que os animais asmáticos (OVA) apresentam um aumento qualitativo na presença de muco no lúmen do epitélio bronquiolar, corado em rosa-magenta, quando comparado aos animais não-asmáticos (SAL). Os animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA) apresentaram menor presença de muco quando comparados com os animais do grupo OVA. O gráfico da Figura 08 demonstra quantitativamente as alterações descritas nas fotomicrografias.

**FIGURA 08** – Presença de muco do epitélio bronquiolar.



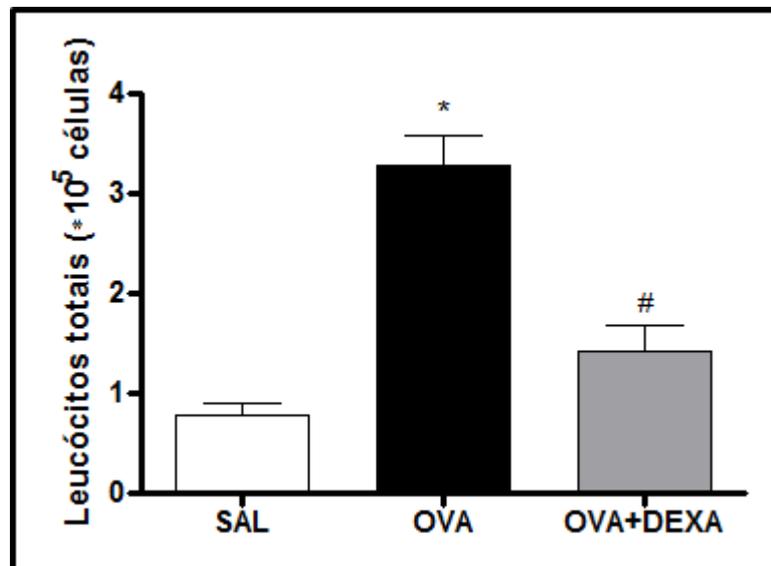
Fotomicrografias com marcação de muco do epitélio bronquiolar e sua respectiva quantificação em Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Aumento: 20x. Análise histológica e quantificação do muco. Setas pretas indicam o muco produzido no epitélio bronquiolar corado de rosa-magenta. Quantificação da presença de muco no epitélio bronquiolar. Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA.

### 5.3 PARÂMETROS GERAIS DE CARACTERIZAÇÃO DA ASMA ALÉRGICA

#### 5.3.1 Contagem total de células no BAL

O desafio intranasal com OVA, por três dias consecutivos, em ratos previamente sensibilizados, aumentou ( $p < 0,05$ ) o número de leucócitos totais no lavado broncoalveolar (315%;  $3,286 \pm 0,28$ ), quando comparado com os animais controle (SAL  $0,79 \pm 0,10$ ). Já os animais OVA+DEXA apresentaram uma diminuição ( $p < 0,05$ ) na quantidade de leucócitos totais quando comparados aos animais OVA (43,03%,  $1,414 \pm 0,26$ ) (Figura 09).

Figura 09 – Avaliação do influxo de leucócitos totais no BAL

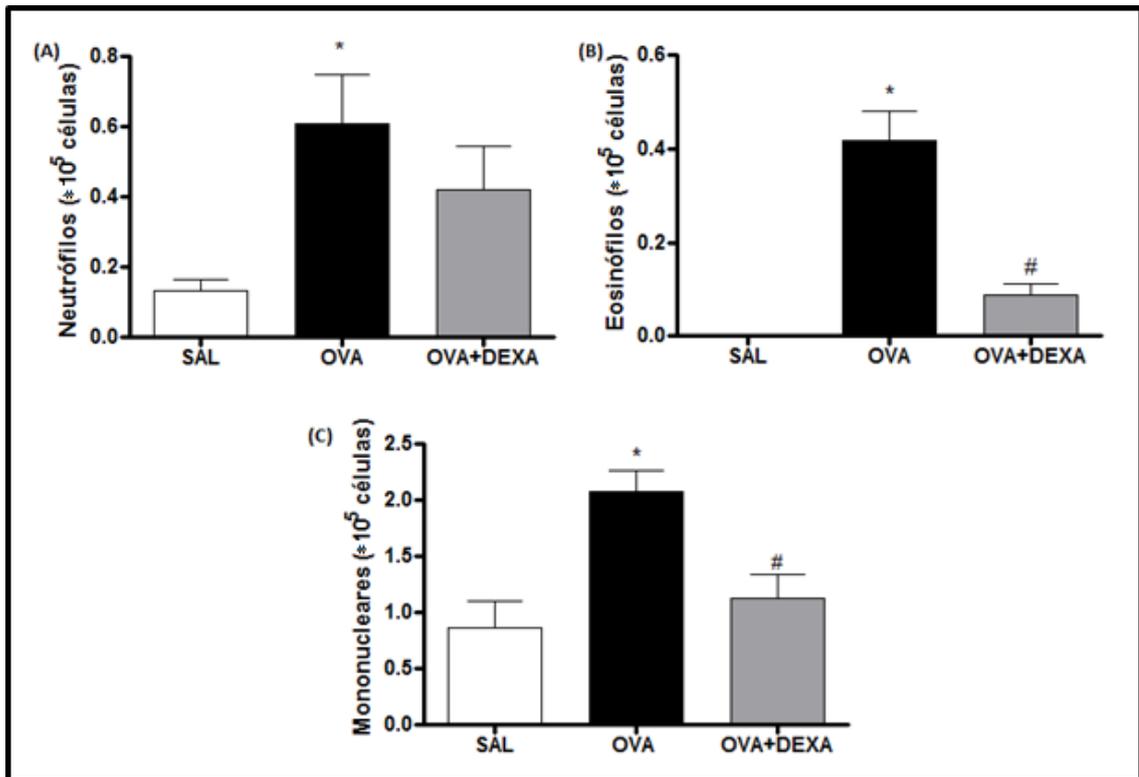


Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA.

#### 5.3.2 Contagem diferencial de células no BAL

A contagem diferencial mostrou um aumento ( $p < 0,05$ ) nos animais OVA em relação aos animais SAL na contagem de eosinófilos, neutrófilos e mononucleares (416%;  $0,416 \pm 0,06$ ; 358,49%;  $0,607 \pm 0,14$ ; 319%;  $2,075 \pm 0,18$ , respectivamente). Além disso, os animais OVA+DEXA apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) de eosinófilos e mononucleares em relação aos animais OVA (21%;  $0,087 \pm 0,24$ ; 54%;  $1,123 \pm 0,22$  respectivamente) (Figura 10).

Figura 10 – Contagem diferencial das células inflamatórias no BAL



Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. # $p < 0,05$  vs SAL; \* $p < 0,05$  vs OVA. (A) contagem de neutrófilos; (B) contagem de eosinófilos; (C) contagem de mononucleares.

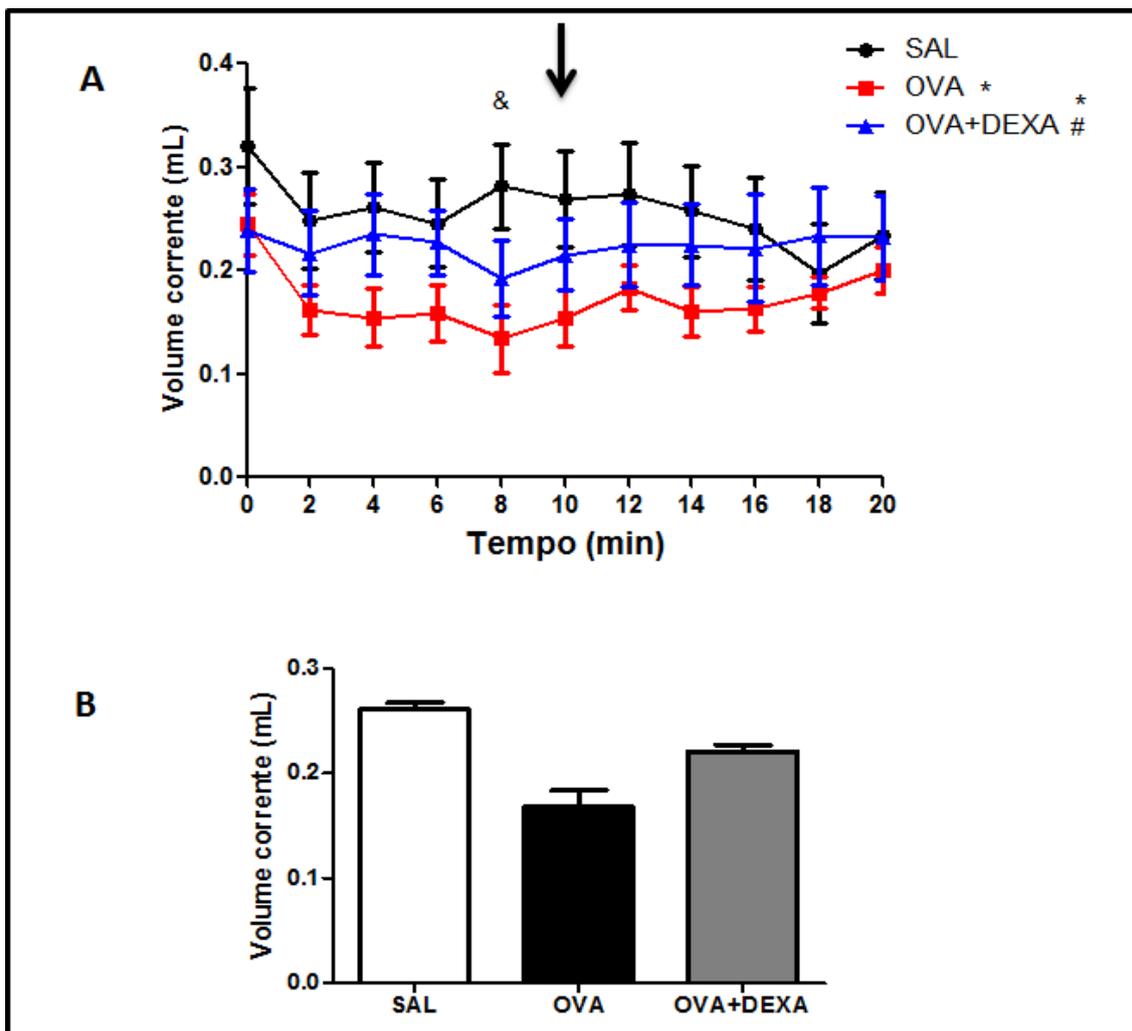
#### 5.4 AVALIAÇÕES ELETROFISIOLÓGICAS DOS PARÂMETROS RESPIRATÓRIOS

Os animais asmáticos (OVA) apresentaram volume corrente reduzido na análise total do registo (de 0 até 20 minutos) ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos animais controles (SAL). Os animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA) também apresentaram esta redução ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais do grupo SAL, porém apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos OVA (FIGURA 11). Na análise entre cada ponto (mesmo minuto), foi observado que no minuto 8 ocorreu diminuição ( $p < 0,05$ ) entre os animais OVA em relação aos SAL e na análise dos valores basais (de 0 até 10 minutos) entre cada grupo não houve diferença ( $p > 0,05$ ) (Figura 11.B). A injeção de pilocarpina não alterou o volume corrente nos animais.

Na análise do volume corrente em função do peso do animal (Figura 12), foi observado que os animais asmáticos (OVA) apresentaram um decaimento na análise total do registo (de 0 até 20 minutos) ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (SAL). Já os

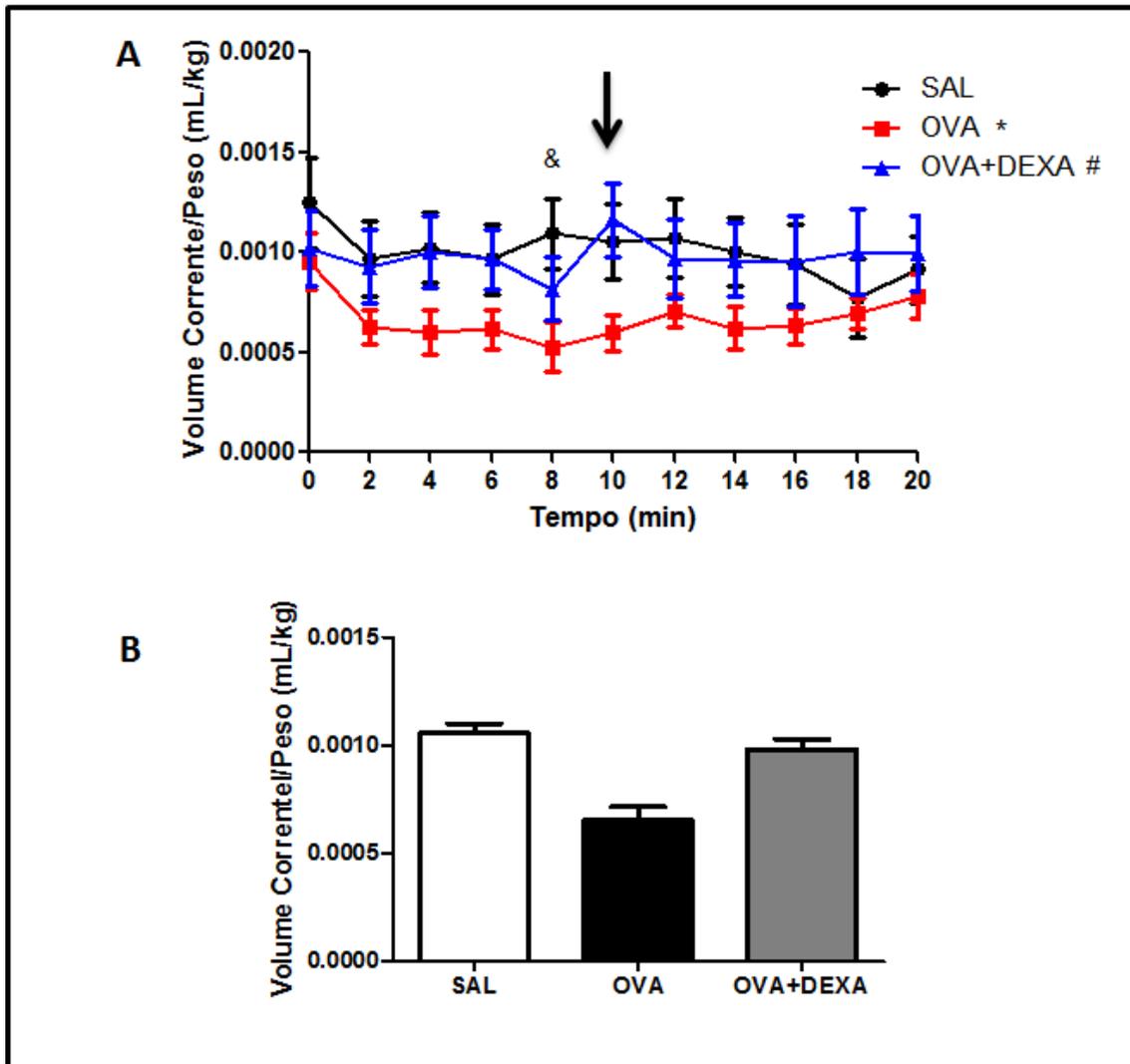
animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA) apresentaram um aumento ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais do grupo OVA. Na análise entre cada ponto, foi observado que no minuto 8 houve uma diminuição ( $p < 0,05$ ) entre os animais OVA em relação aos SAL e na análise dos valores basais (de 0 até 10 minutos) (Figura 11.B) entre cada grupo não ocorreu diferença ( $p > 0,05$ ). A injeção de pilocarpina não alterou o volume corrente nos animais.

Figura 11: Análise Respiratória – Volume Corrente



Avaliação do volume corrente de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. Seta indica administração de pilocarpina. (A) demonstração dos dados ao longo do tempo, sendo 10 minutos o momento da injeção da pilocarpina. (B) média basal dos grupos (do tempo 0 ao 10). \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA. & $p < 0,05$  vs SAL para análise entre grupos no mesmo tempo (min).

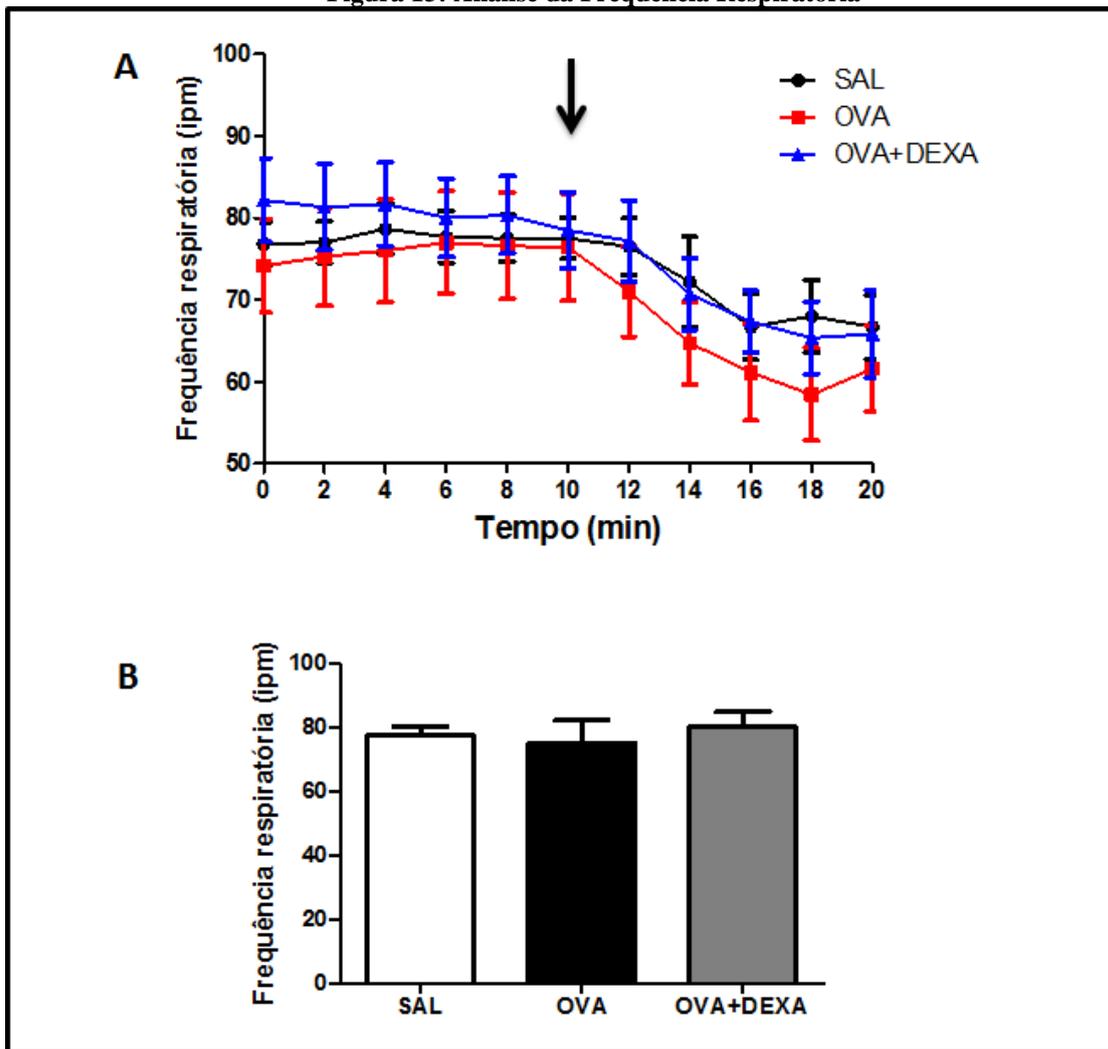
Figura 12: Análise do Volume Corrente em Função do Peso



Avaliação do volume corrente em função do peso de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. Seta indica administração de pilocarpina. (A) demonstração dos dados ao longo do tempo, sendo 10 minutos o momento da injeção da pilocarpina. (B) média basal dos grupos (do tempo 0 ao 10 minutos). \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA. & $p < 0,05$  vs SAL para análise entre grupos no mesmo tempo (min).

A frequência respiratória (FIGURA 13) não foi alterada entre os grupos ( $p > 0,05$ ), no entanto, todos os grupos tendem a uma diminuição após a administração da pilocarpina. Nas análises em cada ponto (mesmo minuto) e na comparação dos valores basais (0 até 10 minutos) também não ocorreu diferença estatística ( $p > 0,05$ ).

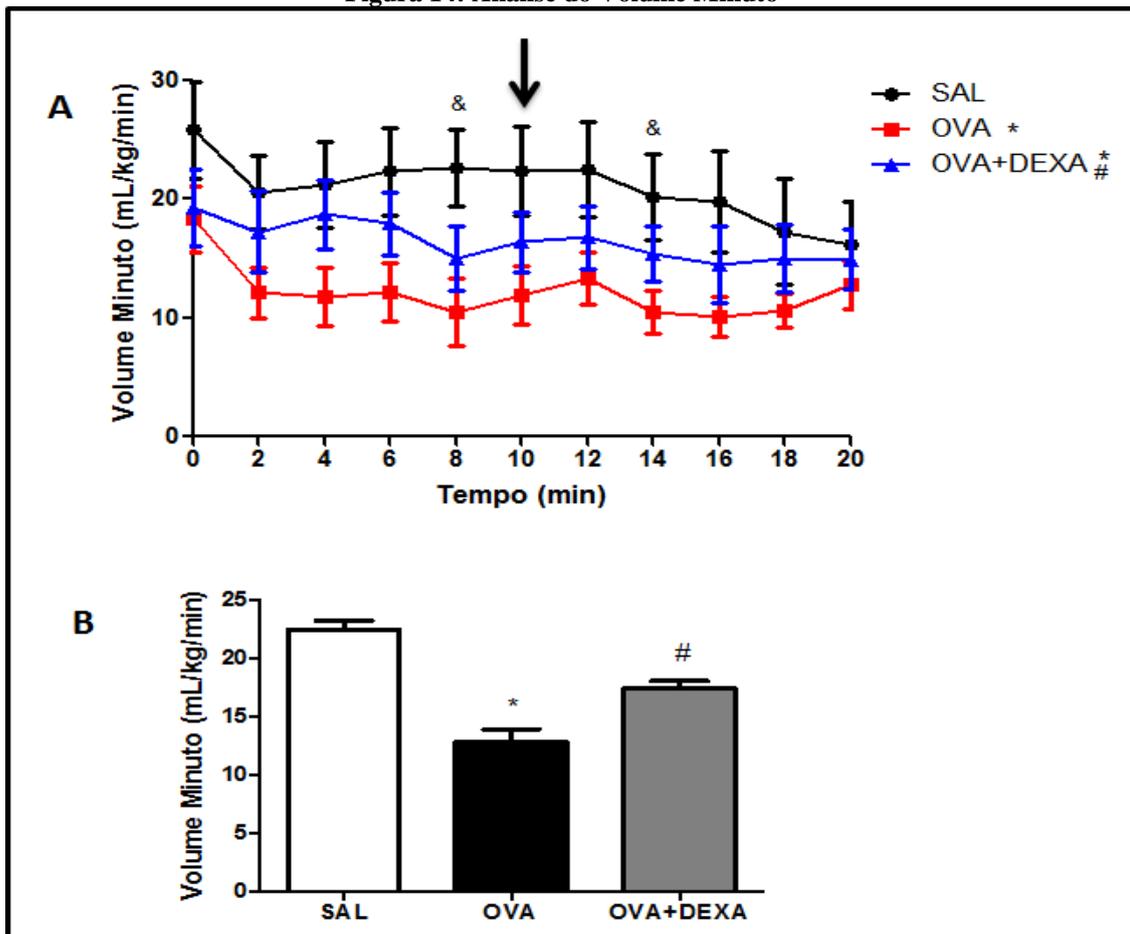
Figura 13: Análise da Frequência Respiratória



Avaliação da frequência respiratória de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. Seta indica administração de pilocarpina. (A) demonstração dos dados ao longo do tempo, sendo 0 o momento da injeção da pilocarpina. (B) média basal dos grupos (do tempo 0 ao 10).

Quanto ao registro do volume minuto (Figura 14) observa-se que os animais do grupo OVA e OVA+DEXA apresentaram um decaimento ( $p < 0,05$ ) em relação aos animais do grupo SAL. Além disto, os animais OVA+DEXA também apresentaram uma diminuição ( $p < 0,05$ ) quando comparados com OVA. Na análise entre cada ponto (mesmo minuto), observamos que nos tempos 8 minutos e 14 minutos ocorreu diminuição ( $p < 0,05$ ) do volume minuto nos animais OVA em relação aos SAL. Os animais OVA apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) do volume minuto durante o período basal em comparação com animais SAL. O tratamento com dexametasona reverteu este parâmetro em animais asmáticos.

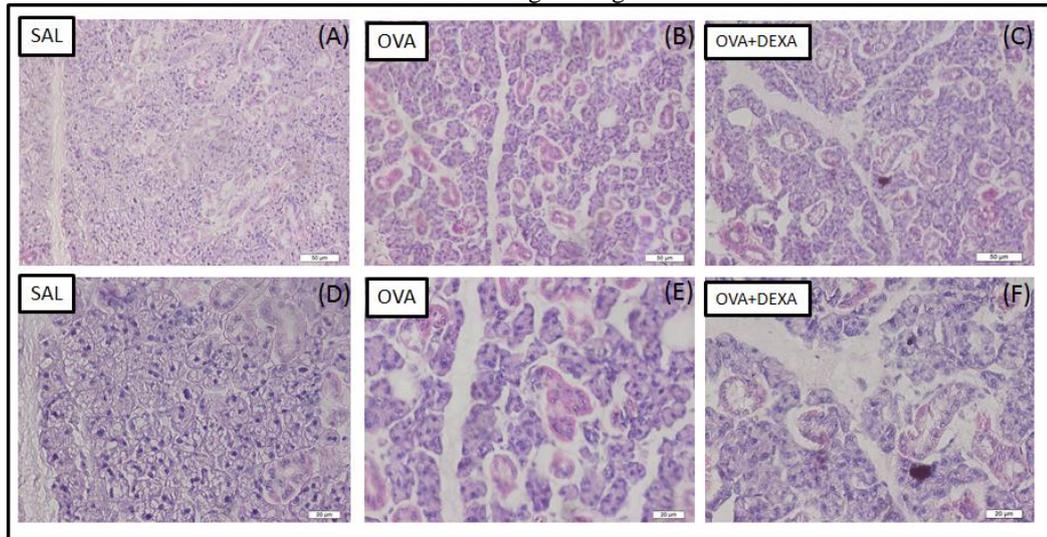
Figura 14: Análise do Volume Minuto



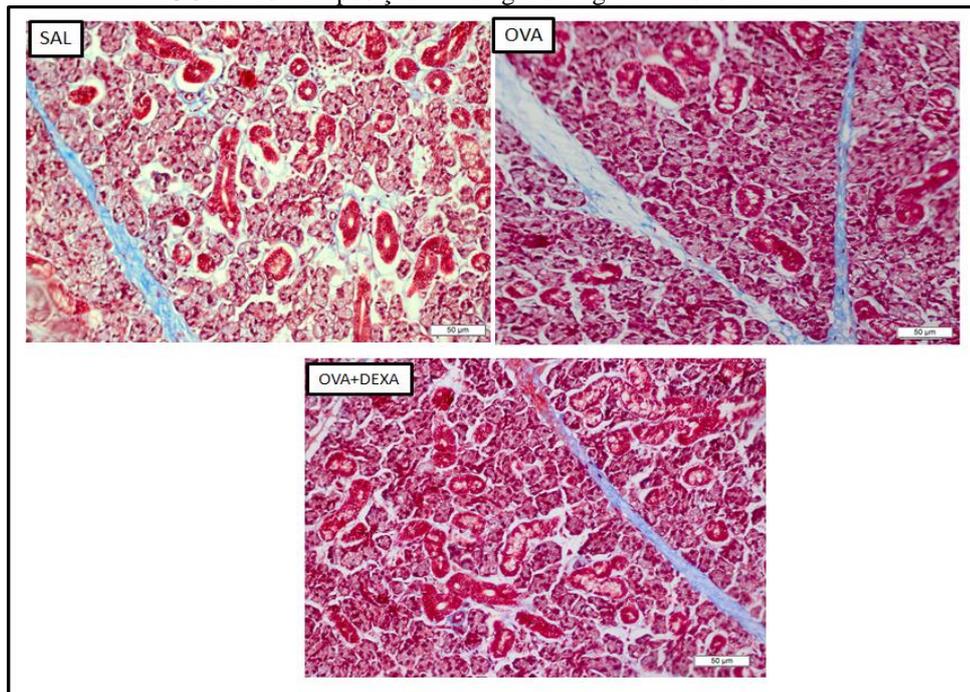
Avaliação do volume minuto de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. Seta indica administração de pilocarpina. (A) demonstração dos dados ao longo do tempo, sendo 0 o momento da injeção da pilocarpina. (B) média basal dos grupos (do tempo 0 ao 10). \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA. & $p < 0,05$  vs SAL para análise entre grupos no mesmo tempo (min).

## 5.5 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR

Os animais controle (SAL) apresentaram normalidade na avaliação dos componentes acinoso e ductal da glândula submandibular e ausência de espaçamentos no parênquima glandular. Os animais OVA apresentaram espaçamentos no parênquima glandular na análise mudanças morfológicas na glândula submandibular. Esta alteração também foi encontrada nos animais do grupo OVA+DEXA. (Figura 15). Na Figura 16 podemos observar a deposição de colágeno de maneira similar nas glândulas submandibulares dos animais SAL, OVA e OVA+DEXA.

**FIGURA 15** - Estrutura histológica da glândula submandibular

Fotomicrografias da estrutura da glândula submandibular coradas pelo método de Hematoxilina-Eosina de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). De A-C aumento de 20x. De D-F aumento de 40x.

**FIGURA 16** – Deposição de colágeno na glândula submandibular

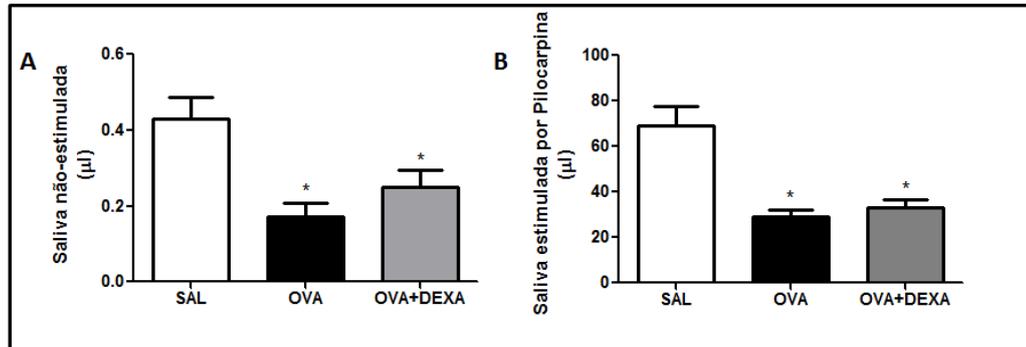
Fotomicrografias da deposição de colágeno na glândula submandibular coradas pelo método de Tricômio de Masson de Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Aumento: 20x.

## 5.6 PARÂMETROS SALIVARES

Os animais asmáticos (OVA) e os animais asmáticos tratados do dexametasona (OVA+DEXA) apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na secreção salivar não-estimulada (39%;  $0,171 \pm 0,03$ ; 57,81%;  $0,248 \pm 0,04$ , respectivamente) quando comparados aos

não-asmáticos (SAL). Este padrão com a diminuição do fluxo salivar nos animais OVA e OVA+DEXA foi mantido mesmo com a estimulação com pilocarpina (42%;  $p < 0,05$ ;  $29,15 \pm 3,16$ ; 48%;  $33,05 \pm 3,17$ , respectivamente) (Figura 17).

**Figura 17:** Quantificação da secreção salivar não-estimulada e estimulada por pilocarpina

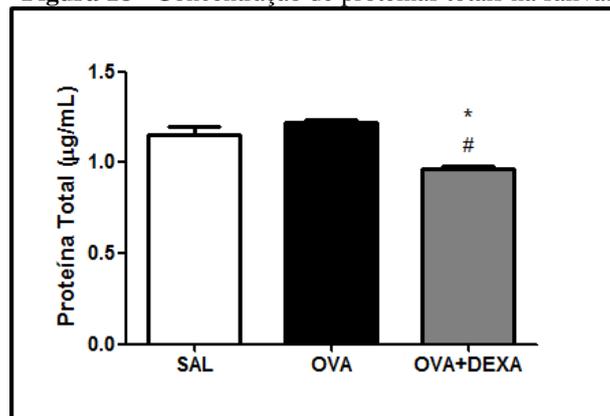


Secreção salivar não-estimulada (A) e secreção salivar estimulada por pilocarpina (B) em Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA.

## 5.7 CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NA SALIVA

Os animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA) apresentaram uma redução ( $p < 0,05$ ) na sua dosagem de proteínas totais quando comparados aos animais SAL e OVA.

**Figura 18 -** Concentração de proteínas totais na saliva.



Concentração das proteínas totais presentes na saliva estimulada em Animais não asmáticos tratados com salina (SAL), Animais asmáticos não tratados (OVA), Animais asmáticos tratados com dexametasona (OVA+DEXA). Dados apresentados por média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais analisados por One-way ANOVA seguido por Newman-Keuls-multiple comparison test. \* $p < 0,05$  vs SAL; # $p < 0,05$  vs OVA.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a secreção salivar em animais submetidos a um modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina. Os principais achados deste trabalho foram que os animais com asma alérgica (grupo OVA) apresentaram uma diminuição da secreção salivar, o que foi parcialmente revertido pelo tratamento padrão com corticoide (grupo OVA+DEXA). Além disso, os animais asmáticos apresentaram um desarranjo no parênquima glandular o que pode estar ligado ao processo de hipossalivação.

A análise da contagem total e diferencial de células, provenientes do lavado broncoalveolar, mostrou que os animais submetidos à sensibilização com ovalbumina apresentaram um maior infiltrado de células (leucócitos) totais, bem como de células (eosinófilos) que caracterizam a inflamação de origem alérgica. Já os animais sensibilizados com ovalbumina e pré-tratados com dexametasona, apresentaram uma diminuição no número destas células totais e específicas, mostrando que o tratamento foi capaz de reverter parcialmente as alterações promovidas pela indução da asma. Este aumento na contagem de células totais e específicas, ou seja, o seu maior recrutamento para o sítio inflamatório após o desafio com ovalbumina e a posterior diminuição após o tratamento com corticoides já está bem descrito na literatura (HASANIN; MURAD, 2014; JIN et al., 2013).

Vale a pena ressaltar que outros modelos experimentais de asma alérgica induzida por ovalbumina, subcutâneo e inalatório ou ainda utilizando a bactéria *Bordetella pertussis bacilli* como adjuvante, também apresentam estes parâmetros inflamatórios celulares (HU et al., 2013; XUE-YAN et al., 2013; CHENG-YE et al., 2013). A caracterização de repercussões respiratórias desencadeadas pela asma foi realizada pela análise funcional respiratória, especialmente evidenciada na redução do volume minuto em período basal. O tratamento com dexametasona reverteu parcialmente as alterações desencadeadas pela asma, apresentando uma elevação no volume corrente e no volume corrente em função do peso quando comparamos os animais do grupo OVA+DEXA com os animais OVA..

Pelo nosso conhecimento este é o primeiro trabalho da literatura que mostrou redução da secreção salivar em modelo experimental de ratos asmáticos. Verificamos que este modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina leva a uma redução significativa da secreção salivar em animais asmáticos e que o tratamento com corticoide (dexametasona) não reverte esta hipossalivação. Em sintonia com este resultado, Paganini e colaboradores (2011), utilizando a secreção salivar de crianças asmáticas, mostraram que o fluxo salivar é estatisticamente reduzido e ainda salienta que mais de 50% de crianças asmáticas apresentam

esta redução. Este estudo aponta ainda para a relação direta da redução salivar com a severidade da asma (PAGANINI et al., 2011). No entanto, como o tratamento com dexametasona promove repercussões respiratórias mas não altera o fluxo salivar, acreditamos que a redução da função respiratória não contribui diretamente com a redução da secreção salivar.

Outros estudos, também realizados em humanos (adultos e crianças), corroboram com este resultado, reafirmando a presença de diminuição da secreção salivar em indivíduos com asma (RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1987; 1991; BJERKEBORN et al., 1987; LENANDER & LUMIKARI et al., 1998; SAG et al., 2007).

Acreditamos que o estabelecimento deste modelo de hipossalivação em animais asmáticos poderá contribuir significativamente para o entendimento de eventos patofisiológicos que promovem este agravo.

Sabendo que a saliva possui um papel muito importante na proteção da mucosa oral, a diminuição deste fluido rico em proteínas, quimiocinas e anticorpos pode levar a diversos problemas na saúde oral, sendo assim, diversos autores relatam a relação entre a asma e a maior prevalência de distúrbios orais (De ALMEIDA et al., 2008). A associação da asma com a saúde oral, como por exemplo, as cáries dentais, a erosão dental, doenças periodontais e mudanças na mucosa oral vêm sendo assunto de debates por diversos cientistas desta área (STEINBACHER; VEERMAN, 2002).

Alguns trabalhos mostram que o tratamento com agonistas  $\beta$ -2 promove a diminuição do fluxo salivar e aumentam o risco de aparecimento da cárie dental. Além disso, a redução na produção de saliva pode afetar o balanço químico natural da mucosa oral (RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1987; AL-DLAIGAN; SHAW; SMITH, 2002; JOHANSSON; ERICSON, 1987).

Tendo em vista que se faz presente na literatura informações de que pacientes asmáticos apresentam uma diminuição na concentração de proteínas totais na saliva quando comparados aos pacientes que não apresentam asma (RYBERG; MOLLER; ERICSON, 1991), investigamos a concentração de proteínas totais em animais com asma alérgica induzida por ovalbumina. Não foi observado alterações na concentração de proteínas totais nos animais asmáticos, no entanto, foi observado, pela primeira vez, diminuição nos animais asmáticos tratados com dexametasona.

Buscando compreender se a diminuição do fluxo salivar em pacientes com asma está associada à alterações histológicas em glândulas submandibulares, realizamos análise com coloração de hematoxilina-eosina. A análise dos achados histopatológicos mostrou a presença

de espaçamentos no parênquima glandular dos animais sensibilizados com ovalbumina sem tratamento e naqueles que foram tratados com dexametasona. Com o intuito de elucidar se há presença de fibrose na glândula submandibular poderia estar envolvida na diminuição da secreção salivar, foi realizada a coloração de tricômio de Masson. Esta nos revelou que a deposição de colágeno de forma similar em animais não-asmáticos e asmáticos. É importante salientar que não foram encontradas na literatura outros trabalhos com análise histológica da glândula salivar em modelo murino de asma alérgica.

Estudos mostram que a hipossalivação pode ser um indicativo de uma desordem na glândula salivar e que o uso contínuo de diversos medicamentos com efeitos colaterais anticolinérgicos podem causar uma destruição irreversível da glândula salivar (SHIP, 2002; SHIP; PILLEMER; BAUM, 2002). Acreditamos que estes espaçamentos possam estar envolvidos nas alterações da secreção salivar.

Muitas medicações podem causar uma disfunção salivar, principalmente as que possuem efeitos anticolinérgicos pela inibição da ligação da acetilcolina com os receptores muscarínicos nas células acinares (BAUM et al., 1993). Dentre estes fármacos estão os anti-histamínicos, betabloqueadores, anticolinérgicos, anti-hipertensivos, antidepressivos, antagonistas de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos e corticoides (STRECKFUS et al., 1994; WISEMAN; FAULDS, 1995; FIELD et al., 1997; TORRES et al., 2002).

O tratamento farmacológico para a hipossalivação é feito através de secretagogos como a pilocarpina, que aumenta as secreções corporais diminuindo a sensação de boca seca (JOHNSON et al., 1993; NIEDERMEIER et al., 1998; VIVINO et al., 1999).

A pilocarpina é normalmente utilizada na terapêutica como um agente estimulante da secreção salivar (FERGUSON, 1993) na dose de 5mg/kg (dose esta também utilizada neste estudo), porém apresenta diversos efeitos adversos como a contração da musculatura lisa, sendo contra indicado para pacientes asmáticos ou com doença pulmonar crônica obstrutiva (CPOD).

Na literatura é visto que a pilocarpina apresenta uma maior eficácia na correção da disfunção da glândula salivar quando comparada com outros agonistas muscarínicos e isto provavelmente ocorre devido à combinação do estímulo da glândula salivar junto com a manutenção da pressão arterial devido a um equilíbrio entre dois mecanismos opostos: hipotensor periférico e mecanismos centrais hipertensivos ativados pela pilocarpina. Entretanto, é necessário considerar que o tratamento pode desencadear um efeito hipertensivo (TAKAKURA et al., 2011).

Outro estudo mostra que injeções periféricas de pilocarpina na dose de 4  $\mu$ mol/kg

reduz a resistência vascular da glândula salivar, apesar de aumentar a pressão arterial e a resistência vascular mesentérica; enquanto que administrada intraperitonealmente a pilocarpina aumenta o fluxo sanguíneo nas glândulas salivares, o que explica a eficácia desta em induzir a salivação (MOREIRA et al., 2003).

Acredita-se que para induzir a salivação a pilocarpina depende da ativação de mecanismos centrais (MOREIRA et al., 2001, 2002; TAKAKURA et al., 2003, 2009; BORELLA et al., 2008). Estudos sugerem que o efeito pressor da pilocarpina é dependente da ativação simpática e da secreção de vasopressina para a ativação de receptores muscarínicos (HOFFMAN et al., 1977; IMAI et al., 1989).

Apesar do grande avanço no entendimento da importância da perfusão sanguínea e das proteínas que promovem o transporte de água na secreção salivar em condições fisiopatológicas ainda é necessário a inserção de coleta de saliva para correlacionar com clássicos parâmetros de indicação de severidade destas doenças crônicas, como a asma. Isto permitirá a criação de novas estratégias tanto para o estabelecimento de terapias para o restaurar a secreção salivar e saúde oral nestes indivíduos, como para a utilização da saliva como fluido diagnóstico. As vias de sinalização e mecanismos moleculares pelos quais ocorrem esta diminuição de fluxo salivar na asma ainda precisam ser investigados.

## **7 CONCLUSÃO**

O conjunto dos resultados do presente trabalho mostra pela primeira vez que o modelo de asma alérgica induzida por ovalbumina em ratos promove diminuição da secreção salivar não-estimulada e estimulada por pilocarpina. Além disso, verificou-se que a dexametasona não promove alterações de fluxo salivar e reduz a concentração de proteínas na saliva, apesar de promover incremento da função respiratória. O presente estudo também contribui para revelar que pacientes asmáticos e pacientes asmáticos sob tratamento com dexametasona estão com alto risco de desenvolver hipossalivação e danos a sua saúde oral.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, AK. **Imunologia celular e molecular**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AGUILERA, G.L.A.; PREMOLI, G.; GONZALEZ, A.; RODRIGUEZ, R.A. Caries risk in children: determined by levels of mutans streptococci and Lactobacillus. **J Clin Pediatr Dent**. v.29, n. 4, p. 329-33, 2005.

AKINBAMI, L.J.; SULLIVAN, S.D.; CAMPBELL, J.D.; GRUNDMEIER, R.W.; HARTERT, T.V.; LEE, T.A.; SMITH, R.A. Asthma outcomes: healthcare utilization and costs. **J Allergy Clin Immunol**. v. 129, p. 49-64, 2012.

AL-DLAIGAN, Y.H.; SHAW, L.; SMITH, A.J. Is there a relationship between asthma and dental erosion? A case control study. **Int J Paediatr Dent**. v. 12, p.189–200, 2002.

AMANO, O. et al. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. **Acta Histochem. Cytochem**. v. 45, n.5, p. 241–250, 2012.

AMERONGEN, A.V.; VEERMAN, A.C. Saliva – the defender of the oral cavity. **Oral Dis**. v. 8, p. 12-22, 2002.

ANDERSON, G.P. Endotyping asthma: new insights into key pathogenetic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. **Lancet**. v. 372, p. 1107–1119, 2008.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International**. v. 150, p. 119–131, 2005.

ARNUP, K.; LUNDIN, S.A.; DAHLLÖF, G. Analysis of pediatric dental services provided at a regional hospital in Sweden. Dental treatment need in medically compromised children referred for dental consultation. **Swed. Dent. J** . v. 17, p. 255 – 9, 1993.

ASPEN, V.A.; STEIN, R.I.; WILFLEY, D.E. An exploration of salivation patterns in normal weight and obese children. **Appetite**. v. 58, n. 2, p. 539-42, 2012.

ATTRILL, M.; HOBSON, P. The organization of dental care for groups of medically handicapped children . **Community Dent. Health**. v. 1, p. 21–7, 1984.

BARNES, P. J. Corticosteroids: The drugs to beat. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 2-14, 2006.

BAUM, B.J.; DAI, Y.; HIRAMATSU, Y.; HORN, V.J.; AMBUDKAR, I.S. Signaling mechanisms that regulate saliva formation. **Crit Rev Oral Biol Medical**. v. 4, p. 379-384, 1993.

BEL, E. H. Clinical phenotypes of asthma. **Curr Opin Pulm Med**. v.10, p. 44-50, 2004.

BJERKEBORN, K; DAHLLÖF, G; HEDLIN, G; LINDELL, M; MODÉER, T. Effect of disease severity and pharmacotherapy of asthma on oral health in asthmatic children. **Scand. J. dent. Res**. v. 95, p. 159-164, 1987.

BORELLA, T.L.; De LUCA Jr, L.A.; COLOMBARI, D.S.; MENANI, J.V. Central muscarinic receptor subtypes involved in peripheral pilocarpine-induced salivation, hypertension and water intake. **Br. J. Pharmacol**. v.155, n.8, p.1256–1263, 2008.

BOUZIGON, E. CORDA, E; ASCHARD, H; DIZIER, M.H.; BOLAND, A; BOUSQUET, J; CHATEIGNER, N; GORMAND, F; JUST, J; Le MOUAL, N; SCHEINMANN, P; SIROUX, V; VERVLOET, D; ZELENKA, D; PIN, I; KAUFFMANN, F; LATHROP, M; DEMENAI, F. Effect of 17q21 variants and smoking exposure in early-onset asthma. **N. Engl. J. Med**. v. 359, p. 1985–1994, 2008.

BRADFORD, M.M. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS n° 709, de 17 de dezembro de 2010. **Diário oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 dez 2010. Seção 1, p. 99.

BUSSE, W.W.; LEMANSKE, R.F. Asthma. **N Engl J Med**. v. 344, p. 350–362, 2001.

CAMPO, P. Phenotypes and Endotypes of Uncontrolled Severe Asthma: New Treatments. **J Investig Allergol Clin Immunol.** v. 23, n. 2, p. 76-88, 2013.

CARPENTER, G.H. et al., The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. **J Physiol.** v. 15, p. 567-573. 1998.

CATALÁN, A.M.; NAKAMATO, T.; MELVIN, J.E. The salivary gland fluid secretion mechanism. **J. Med. Invest.**, v. 56, p. 192-196, 2009.

CHIAPPARA, G.; GAGLIARDO, R.; SIENA, A.; BONSIGNORE, M.R.; BOUSQUET, J.; BONSIGNORE, G.; VIGNOLA, A.M. Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** v. 1, n. 1, p. 85-93, 2001.

CONRAD, M. L. et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 1246–1254, 2009.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p.785-797, 2008. Suplemento.

De ALMEIDA, P.V.; GRÉGIO, A.M.; MACHADO, M.A.; De LIMA, A.A.; AZEVEDO, L.R. Saliva composition and functions: a comprehensive review. **J Contemp Dent Pract.** v. 9, p. 72-80, 2008.

DOLAN, C.; FRAHER, K.E.; BLEECKER, E.R.; BORISH, L.; CHIPPS, B.; HAYDEN, M.L.; WEISS, S.; ZHENG, B.; JOHNSON, C.; WENZEL, S. Design an baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: outcomes and treatment regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. **Ann. Allergy Asthma Immunol.** v. 92,p. 32–39, 2004.

EDGAR, W.M. Saliva: its secretion, composition and functions. **Br Dent J.** v. 172, p. 305-312, 1992.

ERSIN NK, GÜ LEN F, ERONAT N et al. Oral and dental manifestations of young

asthmatics related to medication, severity and duration of condition. **Pediatr Int** v. 48, p. 549–554, 2006.

FERGUSON, Martin M. Pilocarpine and other cholinergic drugs in the management of salivary gland dysfunction. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 75, n. 2, p. 186-191, 1993.

FIELD, E.A; LONGMAN, L.P; BUCKNALL, R; KAIE, S.B; HIGHAM, S.M; EDGAR, W.M. The establishment of a xerostomia clinics: a prospective study. **Brazilian Journal of Oral Maxillofacial Surgery** v. 35, n. 2, p. 96-103, 1997.

FOLLENWEIDER, L. M.; LAMBERTINO, A. Epidemiology of Asthma in the United States. **Nurs Clin N Am**, v. 48, p. 1-10, 2013.

FOX PC. Saliva composition and its importance in dental health. **Compend Suppl** v. 13, p.457-460, 1989.

GARRETT, J.R. The proper role of nerves in salivary secretion. **J Dent Res**. v. 66. p. 387-397, 1987.

GENESER, F. Atlas color de histología. 1. ed. Madri: Medica Panamericana, 1998.

GLOBAL INITIATIVE FOR ASTHMA (GINA). Global strategy for asthma management and prevention. **GINA [online]**, <http://www.ginasthma.org/pdf/archived/GINAWorkshop05Clean.pdf> (2005).

GREABU, M. et al. Saliva - a diagnostic window to the body, both in health and in disease. **Journal of Medicine and Life**. v. 2, n. 2, p. 124-132, 2009.

GRISIUS M.M. Salivary gland dysfunction: A review of systemic therapies. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics**. v. 92, n. 2, p. 156-62, 2001.

GUO, J.; HAN, B.; QIN, L.; LI, B.; YOU, H. Pulmonary Toxicity and Adjuvant Effect of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate in Ovalbumin-Immunized BALB/c Mice. **PLoS ONE**. v.7, n.6, 2012.

HAMLAR, D.D; SCHULLER D.E; GAHBAUER R.A; BUERKI R.A; STAUBUS A.E; HALL J; ALTMAN J.S; ELZINGA D.J; MARTIN M.R. Determination of the efficacy of topical oral pilocarpine for postirradiation xerostomia in patients with head and neck carcinoma. **Laryngoscope**. v. 106, n. 8, p. 972-976, 1996.

HASANIN, A.H.; MURAD, H.A. The anti-inflammatory effects of 1,1 dimethyl-4-phenylpiperazinium (DMPP) compared to dexamethasone in a guinea pig model of ovalbumin induced asthma. **Eur Ver for Med and Pharmacol Sci**. v.18, p. 2228-2236, 2014.

HOFFMAN, W.E., PHILIPS, M.I., SCHMID, P.G., FALCON, J., WEET, J.F. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**. v. 16, n. 7–8, p. 463–472, 1977.

HOLGATE, S. T. Innate and adaptive immune responses in asthma. **Nature medicine**. v.18, n. 5, p. 673-683, 2012.

HOLMES, S. The Management of Xerostomia in Older Adults. **Reviews in clinical gerontology**. v. 9, p. 317-326, 1999.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, p. 162-169, 2001.

IMAI, Y., ABE, K., SASAKI, S., MINAMI, N., MUNAKATA, M., YUMITA, S., NOBUNAGA, T., SEKINO, H., YOSHINAGA, K. Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. **Hypertension**. v. 13, p. 549–557, 1989.

JIM, H., LUO, Q., ZHENG, Y., NURAHMAT, M., WU, J., LI, B., LV, Y.B., WANG, G., DUAN, X., DONG, J.C. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells contribute to the antiasthmatic effects of *Astragalus membranaceus* extract in a rat model of asthma. **Inter Immunopharm**. v. 15, p. 42-49, 1993.

- JOHANSSON, I.; ERICSON, T. Saliva composition and caries development during protein deficiency and beta-receptor stimulation or inhibition. **J Oral Pathol.** v.16, p. 145–149, 1987.
- JOHNS, D. P. et al. Airway distensibility in healthy and asthmatic subjects: effect of lung volume history. **J. Appl. Physiol.** v. 88, p. 1413–1420, 2000.
- JOHNSON J.T., FERRETTI G.A., NETHERY W.J. et al. Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. **N Engl J Med.** v.329, p. 390-395, 1993.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- KILLEEN, K., SKORA, E. Pathophysiology, Diagnosis, and Clinical Assessment of Asthma in the Adult. **Nurs Clin N Am,** v. 48, p. 11-23, 2013.
- KOCZOR-ROZMUS A., ZWIRSKA-KORCZALA K., SADLAK-NOWICKA J., ILEWICZ L., MAYER-PARKA D., WIERUCKA-MŁYNARCZYK B. Evaluation of salivary gland function in women with autoimmune thyroid diseases. **Wiad lek** v. 56, n. 9-10, p. 412-8, 2003.
- KUDO, M. et al. Pathology of asthma. **Frontiers in Microbiology.** v.4, n. 263, p. 1-16, 2013.
- LECHNER, A.J.; MATUSCHAK, G. M.; BRINK, D. S. **Pulmões: uma Abordagem Integrada à Doença.**1. ed. Porto Alegre: Mcgraw Hill, 2013.
- LAURIKAINEN, K.; KUUSISTO, P. Comparison of the oral health status and salivary flow rate of asthmatic patients with those of nonasthmatic adults-results of a pilot study. **Allergy.** v.53, n. 3, p. 316-9, 1998.
- LENANDER-LUMIKARI, M.; LAURIKAINEN, K.; KUUSISTO, P.; VILJA, P. Stimulated salivary flow rate and composition in asthmatic and non-asthmatic adults. **Arch Oral Biol.** v. 43, n.2, p. 151-156, 1998.
- LÖFGREN, C.D. et al. A systematic review of methods to diagnose oral dryness and salivary gland function. **BMC Oral Health.** v. 8: p. 12-29, 2012.

MARQUES, K.R.S.; SOUZA-MACHADO, A. Doença periodontal e asma: revisão de literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**. v.10, n.3, p.263-269, 2010.

MELVIN, J.E. et al. Regulation of fluid and eletrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu Rev Physiol**. v. 67, p. 445-469, 2005.

MESCHER, A. L. Junqueira's Basic Histology, 12. ed. Estados Unidos: McGraw-Hill, 2010.

MILANO, M. Increased risk for dental caries in asthmatic children. **Tex. Dent. J.** v. 116, p. 35–42, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pesquisa Nacional da Saúde – DATASUS, Departamento de Informática do SUS**. Esplanada dos Ministérios, Brasília, DF. 23 de Janeiro de 2015.

MONTEIRO, R. et al. Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to the pulmonary emphysema: experimental study in rats. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 19, n. 4, p. 341-347, 2004.

MOREIRA, T.S., TAKAKURA, A.C., De LUCA Jr, L.A., RENZI, A., MENANI, J.V. Moxonidine reduces pilocarpine-induced salivation in rats. **Aut. Neurosci. Basic Clin**. v. 91, p. 32–36, 2001.

MOREIRA, T.S., TAKAKURA, A.C., De LUCA Jr, L.A., RENZI, A., MENANI, J.V. Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline. **Arch. Oral Biol**. v. 47, p. 429–434, 2002.

MOREIRA, T.S., TAKAKURA, A.C., COLOMBARI, E.; De LUCA Jr, L.A., RENZI, A., MENANI, J.V. Central monoxidine on salivary gland blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine. **Brain Research**. v. 987, p. 155–163, 2003.

NAKAGAWA, N.K. et al. Mucociliary clearance is impaired in acutely ill patients. **Chest**. v. 128, n. 4, p. 2772-2777, 2005.

NIEDERMEIER W, MATTHAEUS C, MEYER C, STAAR S, MULLER R.P, SCHULZE H.J. Radiation-induced hyposalivation and its treatment with oral pilocarpine. **Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod.** v. 86, p. 541-549, 1998.

PAGANINI, M; DEZAN C.C; BICHACO T.R; De ANDRADE F.B; NETO A.C; FERNANDES K.B. Dental caries status and salivary properties of asthmatic children and adolescents. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 21, n. 3, p. 185-191, 2011.

PAWANKAR, R. et al. State of World Allergy Report 2011: Allergy and Chronic Respiratory Diseases. **WAO Journal**, p. S4-S17, Jun. 2011. Suplemento.

PEDERSEN, A.M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis.** v. 8, p. 117-129, 2002.

PLATTS-MILLS, T.A.; SPORIK, R.B.; WHEATLEY, L.M; HEYMANN, P.W. Is there a dose-response relationship between exposure to indoor allergens and symptoms of asthma? **The Journal of Allergy and Clinical Immunology.** v. 96, p. 435-440, 1995.

ROCHE, W. R. et al. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. **Lancet**, v. 1, p. 520–524, 1989.

RUHL, S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. **Expert Rev Proteomics.** v. 9, n.1, p. 85-96, 2012.

RYBERG, M.; MOLLER, C.; ERICSON, T. Effect of B<sub>2</sub> –adrenoceptor agonist on saliva proteins and dental caries in asthmatic children . **J. Dent. Res.** v. 66, p.1404–6, 1987.

RYBERG, M.; MÖLLER, C.; ERICSON, T. Saliva composition in asthmatic patients after treatment with two dose levels of a beta 2-adrenoceptor agonist. **Arch Oral Biol.** v. 35, n. 12, p. 945-948, 1990.

RYBERG, M.; MÖLLER, C.; ERICSON, T. Saliva composition and caries development in asthmatic patients treated with beta 2-adrenoceptor agonists: a 4-year follow-up study. **Scand J Dent Res.** v. 99, p. 212-218, 1991.

ROSS, M.J; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SABINO-SILVA, R. et al. Na<sup>+</sup>-Glucose Cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potencial involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. **Journal of Membrane Biology.** v. 228, p. 63-69, 2009.

SAG, C.M.D., OZDEN, F.O.; ACIKGOZ, G.; ANLAR, F.Y. The Effects of Combination Treatment with a Long-Acting  $\beta$ 2-Agonist and a Corticosteroid on Salivary Flow Rate, Secretory Immunoglobulin A, and Oral Health in Children and Adolescents with Moderate Asthma: A 1-Month, Single-Blind Clinical Study. **Clinical Therapeutics.** v. 29, n.10, p. 2236-2242, 2007.

SALDIVA, P.H.N. Aparelho mucociliar: aspectos funcionais e métodos de estudo. **Jornal Brasileiro de Pneumologia.** v. 16, n. 3, p. 161-170, 1990.

SHIP, J.A. Salivary Glands and Saliva. **Oral Diseases.** v.8, p. 77-89, 2002.

SHIP, J.A.; PILLEMER, S.R.; BAUM, B.J. Xerostomia and the geriatric patient. **J Am Geriatr Soc.** v. 50, p. 535-543, 2002.

STEINBACHER, A.V.N.; VEERMAN, E.C.I. Saliva – the Defender of the Oral Cavity. **Oral Diseases.** v. 8, n.2, p. 12-22, 2002.

STENSSON M, WENDT LK, KOCH G, OLDAEUS G, BIRKHED D. Oral health in preschool children with asthma. **Int J Paediatr Dent.** v. 18, p. 243–250, 2008.

STRECKFUS, C.F.; WU, A.J.; SHIP, J.A.; BROWN, L.J. Stimulated parotid gland salivary flow rates in normotensive, hypertensive, and hydrochlorothiazide-medicated African Americans. **J Oral Path Med** v. 23, p. 280-283, 1994.

TAKAKURA, A.C., MOREIRA, T.S., LAITANO, S.C., De LUCA Jr, L.A., RENZI, A., MENANI, J.V. Central muscarinic receptors signal pilocarpine-induced salivation. **J. Dent. Res.** v. 82, p. 993–997, 2003.

TAKAKURA, A.C.T; Moreira T.S; De Luca L.A; Jr, Renzi A; Menani J.V; Colombari E. Effects of AV3V lesion on pilocarpine-induced pressor response and salivary gland vasodilation. **Brain research**, v. 1055, n. 1, p. 111-121, 2005.

TAKAKURA, A.C., MOREIRA, T.S., BORELLA, T.L.; PAULIN, R.F.; COLOMBARI, D.S., De LUCA Jr, COLOMBRI, E. L.A., MENANI, J.V. Central mechanisms involved in pilocarpine-induced pressor response. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 164, p. 34–42, 2011.

TAKAKURA, A.C., MOREIRA, T.S., COLOMBARI, D.S., De LUCA Jr, L.A., MENANI, J.V. Activation of alpha(2)-adrenoceptors in the lateral hypothalamus reduces pilocarpine-induced salivation in rats. **Neurosci. Lett.** v. 450, p. 225–228, 2009.

TAYLOR, S. E.; AL-HASHIMI, I. Pilocarpine, an old drug; a new formulation. **Texas Dent. J.**, v. 113, n. 10-12, p. 9-13, 1996.

THAYSEN, J.H.; THORN, N.A.; SCHWARTZ, I.L. Excretion of sodium, potassium, chloride e carbon dioxide in human parotid saliva. **Am J Physiol.** v.178, p. 155-159, 1954.

THOMAS, M.S.; PAROLIA, A.; KUNDABALA, M.; VIKRAM, M. Asthma and oral health: a review. **Australian Dental Journal.** v. 55, p. 128-133, 2010.

TO, T. et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. **BMC Public Health**, v. 12, p. 3-8, 2012.

TORRES S.R; LOTTI R.S; PEIXOTO C.B; GRACA P.A.C; LIMA M.E.P; PINA C.C et al. Verificação da eficácia de um questionário para detecção de hipossalivação. **Revista Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas**. v. 56, p. 227-31, 2002.

TURNER, R.J.; SUGIYA, H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Dis.**; v. 8, p. 3-11, 2002.

VATTA, M.S et al. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. **Auton Autacoid Pharmacol**. v. 22, p. 65-71. 2002

VIGNOLA, A.M.; CHANEZ, P.; CAMPBELL, A.M.; SOUQUES, F.; LEBEL, B.; et al. Airway inflammation in mild intermittent and in persistent asthma. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 157, p. 403-409, 1998.

VIVINO, F.B.; AL-HASHIMI, I.; KHAN, Z.; Le VEQUE, F.G.; SALISBURY, P.L.<sup>3rd</sup>; TRAN-JOHNSON, T.K. Pilocarpine tablets for the treatment of dry mouth and dry eye symptoms in patients with Sjogren syndrome: A randomized, placebo-controlled, fixed-dose, multicenter trial. **Archives of Internal Medicine**. p. 174-181, 1999.

WISEMAN, L.R; FAULDS, D. Oral pilocarpine: a review of its pharmacological properties and clinical potential in xerostomia. **Drugs**, v. 49, n. 1, p. 143-155, 1995.

ZALEWSKA, A. et al. Impact of salivary flow and lysozyme content and output on the oral health of rheumatoid arthritis patients. **Postepy Hig Med Dosw**. v. 65, p. 40-45, 2011.

ZEUTHEN, T. Molecular water pumps. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**. v.141, p. 97-151, 2000.