

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
UNESP  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E PATOLOGIA,  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA.  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS  
CONVÊNIO UFSCar/UNESP**

**PAPEL DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS DA ÁREA  
PREÓPTICA MEDIAL (APM) NO CONTROLE DA SALIVAÇÃO  
INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO COLINÉRGICA EM RATOS**

**Roberto Lopes de Almeida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia.

**São Carlos  
Dezembro/2004**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

A447pe

Almeida, Roberto Lopes de.

Papel dos receptores adrenérgicos da área preóptica medial (APM) no controle da salivação induzida pela ativação colinérgica em ratos / Roberto Lopes de Almeida. -- São Carlos : UFSCar, 2005.

56 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Glândulas salivares. 2. Pilocarpina. 3. Noradrenalina. 4. Salivação. 5. APM. I. Título.

CDD: 611.316 (20<sup>a</sup>)

**Aos meus pais que não mediram esforços  
na dedicação aos filhos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores que passaram pela minha vida antes da graduação;

Aos professores da graduação por me mostrarem o caminho;

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos e pelo incentivo;

Aos professores da banca examinadora;

Ao Prof. Renzi pela oportunidade e por colaborar para transformar um educador físico em um fisiologista;

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia da UNESP-Araraquara pelo apoio técnico e pela manutenção do laboratório;

Aos amigos do laboratório pela amizade e pela disposição de sempre estarem presentes e prontos para ajudar;

Aos amigos da graduação que de uma certa maneira contribuíram para eu chegar onde estou;

Aos amigos, que vivem no meu pensamento para sempre;

À Dna Luzia pela amizade respeito e ensinamentos passados a mim com maestria;

Aos meus primos que sempre estão juntos comigo para o que der e vier;

À minha avó paterna Alice que além de amar a todos de uma maneira única nos deixou o “gene” da união, da perseverança e da força;

Aos meus avós maternos Manoel e Yvone pelo amor incondicional aos netos;

Aos meus padrinhos Odair e Rozzanna pelo incentivo de sempre e por se mostrarem presentes em toda a minha vida;

Aos meus irmãos Luciana e André por serem minha família, pela união e aprendizado contínuo;

À minha namorada Camila, grande amor e razão dos meus passos pela paciência, dedicação, amor, carinho, companheirismo e respeito que mostra ter por mim desde que nos conhecemos;

Aos meus pais que formaram e educaram os filhos com a maior dedicação e amor possíveis. Se eu conseguir fazer pelos meus filhos metade do que eles fizeram por mim, meus filhos serão no mínimo pessoas muito honestas;

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Corte histológico mostrando a lesão bilateral da APM.

FIGURA 2: Corte histológico mostrando o implante na APM.

FIGURA 3: Secreção salivar basal e induzida por injeção ip de pilocarpina (mg/7min) em ratos que sofreram lesão da APM 24 horas antes do experimento.

FIGURA 4: Secreção salivar basal e induzida por injeção ip de pilocarpina (mg/7min) em ratos que sofreram lesão da APM 5 dias antes do experimento.

FIGURA 5: Secreção salivar basal e induzida por injeção ip de pilocarpina (mg/7min) em ratos que sofreram lesão da APM 15 dias antes do experimento.

FIGURA 6: Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de noradrenalina (NOR; 80 e 160 nmol) ou salina.

FIGURA 7: Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de Prazosin (Prazosin; 160 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina

FIGURA 8: Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de RX-821002 (RX; 160 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina.

FIGURA 9: Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de RX-821002 (RX; 160 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina.

FIGURA 10: Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de RX-821002 (RX; 320 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	4
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
EXPERIMENTOS QUE FORAM REALIZADOS.....	20
HISTOLOGIA.....	25
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a participação dos mecanismos adrenérgicos da área preóptica medial (APM) na secreção salivar induzida pela estimulação colinérgica (injeção de pilocarpina) periférica. Foram utilizados Ratos Holtzman (280-320 g). Uma parte dos animais sofreu lesão na APM através da passagem de corrente elétrica (1mA x 3x10s), para servir de controle, uma outra parte dos animais foi submetida aos mesmos procedimentos de cirurgia cerebral, exceto que não foi exposta à passagem de corrente elétrica (lesão fictícia). Foram utilizados também animais que sofreram a cirurgia de implante de cânulas guia na APM para a injeção de agonistas e antagonistas adrenérgicos. A saliva foi coletada utilizando-se bolas de algodão previamente pesadas e inseridas na boca do animal que se encontrava sob anestesia por quetamina (1mg/mL/kg). A salivação foi induzida por injeção intraperitoneal (ip) de pilocarpina (1mg/mL/kg). A lesão da APM reduziu a salivação induzida por pilocarpina ip tanto no grupo que sofreu lesão da APM 24 horas antes do experimento (lesão APM  $340,7 \pm 41,1$  mg/7min, vs. LF  $428,4 \pm 31,6$  mg/7min) quanto no grupo que sofreu a lesão 5 dias antes do experimento (lesão APM  $310,2 \pm 35,4$  mg/7min, vs. LF  $494,9 \pm 35,5$  mg/7min). Não foi verificada redução na salivação induzida por pilocarpina ip nos animais que sofreram lesão 15 dias antes do experimento. (lesão APM  $461,6 \pm 81,4$  mg/7min, vs. LF  $575,7 \pm 34,9$  mg/7min). A injeção de noradrenalina (80 nmol/0,5 $\mu$ L) na APM não reduziu a salivação induzida por pilocarpina ip (NOR + Pilo  $356,0 \pm 36,0$  mg/7min vs. Salina + Pilo  $475,0 \pm 73,0$  mg/7min) Essa mesma droga na dose de 160 nmol/0,5 $\mu$ L reduziu a salivação induzida por pilocarpina ip (NOR + Pilo  $251,0 \pm 50,0$  mg/7min vs. Salina + Pilo  $468,0 \pm 59,0$  mg/7min). O efeito inibitório da injeção na APM de noradrenalina (160 nmol/0,5 $\mu$ L) na salivação induzida por pilocarpina ip não foi reduzido pela injeção prévia do antagonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , RX-821002 na dose de 80 nmol/0,5 $\mu$ L (RX + NOR + Pilo  $244,1 \pm 29,2$  mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo  $202,3 \pm 34,8$  mg/7min). Já essa mesma droga injetada na dose de 160 nmol/0,5 $\mu$ L, reverteu parcialmente o efeito inibitório da injeção na APM de noradrenalina (160 nmol/0,5 $\mu$ L) na salivação induzida por pilocarpina ip (RX + NOR + Pilo  $329,9 \pm 77,8$  mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo  $148,2 \pm 30,3$  mg/7min). O RX-821002 injetado na APM na dose de 320 nmol/0,5 $\mu$ L, falhou em mostrar a reversão do efeito inibitório da injeção também na APM de noradrenalina (160nmol/0,5 $\mu$ L) na salivação induzida por pilocarpina ip (RX + NOR + Pilo  $261,3 \pm 18,9$  mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo  $320,4 \pm 30,2$  mg/7min). O antagonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ , Prazosin, não se mostrou eficaz pois o efeito inibitório da injeção na APM de noradrenalina (160 nmol/0,5 $\mu$ L) na salivação induzida por pilocarpina ip não foi reduzido pela injeção prévia do antagonista adrenérgico  $\alpha_1$ , Prazosin, na dose de 160 nmol/0,5 $\mu$ L (Prazosin + NOR + Pilo  $223,6 \pm 35,8$  mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo  $256,0 \pm 58,5$  mg/7min). Os resultados mostram que a noradrenalina injetada na APM reduz a salivação induzida pela pilocarpina ip e que esse efeito é reduzido pelo bloqueio prévio dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  da mesma área, sugerindo a existência de um mecanismo adrenérgico  $\alpha_2$  inibitório da salivação na APM.

## ABSTRACT

The present work had as objective to investigate the participation of the mechanisms adrenergics of the medial preoptic area (APM) in the salivary secretion induced for the peripheral colinergic stimulation (pilocarpine injection). Holtzman rats had been used (280-320 g). A part of the animals suffered electrolytic lesion in the APM through the ticket from electric chain (1mA x 3x10s), to serve as control, and another part of the animals was submitted to the same procedures of cerebral surgery, except that it was not displayed to the electric chain ticket (SHAM). Animals that suffered the surgery from implant of cannulas guides in the APM for the injection of adrenergics agonists and antagonists were also used. The saliva was collected using previously weighted and inserted balls of cotton in the mouth of the animal that was under anesthesia with quetamina (1mg/mL/kg). Salivation was induced for intraperitoneal injection (IP) of pilocarpine (1mg/mL/kg). The APM lesion in such a way reduced peripheral the pilocarpine-induced salivation group that suffered APM lesion 24 hours before the experiment (APM lesion  $340,7 \pm 41,1$  mg/7min, versus SHAM  $428,4 \pm 31,6$  mg/7min) as much as in the group that suffered APM lesion 5 days before the experiment (APM lesion  $310,2 \pm 35,4$  mg/7min, versus SHAM  $494,9 \pm 35,5$  mg/7min). Reduction in the peripheral pilocarpine-induced salivation was not verified in those animals that had suffered APM lesion 15 days before the experiment (APM lesion  $461,6 \pm 81,4$  mg/7min, versus SHAM  $575,7 \pm 34,9$  mg/7min). The injection of noradrenaline (80 nmol/0,5 $\mu$ L) in the APM did not reduce the peripheral pilocarpine-induced salivation (NOR + Pilo  $356,0 \pm 36,0$  mg/7min versus Saline + Pilo  $475,0 \pm 73,0$  mg/7min). This same drug in the dose of 160 nmol/0,5  $\mu$ L reduced the peripheral pilocarpine-induced salivation (NOR + Pilo  $251,0 \pm 50,0$  mg/7min versus Saline + Pilo  $468,0 \pm 59,0$  mg/7min). The inhibitory effect of the injection in the APM of noradrenaline (160 nmol/0,5 $\mu$ L) in the peripheral pilocarpine-induced salivation was not reduced by the previous injection of the antagonist of adrenoceptors  $\alpha_2$ , RX-821002 in the dose of 80 nmol/0,5 $\mu$ L (RX + NOR + Pilo  $244,1 \pm 29,2$  mg/7 min, versus Saline + NOR + Pilo  $202,3 \pm 34,8$  mg/7 min). On the other hand, this same drug injected in the dose of 160 nmol/0,5 $\mu$ L, partially reverted the inhibitory effect of the injection in the APM of noradrenalina (160 nmol/0,5 $\mu$ L) in the peripheral pilocarpine-induced salivation (RX + NOR + Pilo  $329,9 \pm 77,8$  mg/7min, versus Saline + NOR + Pilo  $148,2 \pm 30,3$  mg/7min). The RX-821002 injected in the APM in the dose of 320 nmol/0,5 $\mu$ L, failed in showing the reversion of the inhibitory effect of the injection in the APM of noradrenaline (160nmol/0,5 $\mu$ L) in the peripheral pilocarpine-induced salivation (RX + NOR +  $261,3 \pm 18,9$  mg/7min, versus Saline + NOR + Pilo  $320,4 \pm 30,2$  mg/7min). The antagonist of adrenergics receptors  $\alpha_1$ , Prazosin, did not reveal efficient, therefore the inhibitory effect of the injection in the APM of noradrenaline (160 nmol/0,5 $\mu$ L) in the peripheral pilocarpine-induced salivation was not reduced by the previous injection of the adrenergic antagonist  $\alpha_1$ , Prazosin, in the dose of 160 nmol/0,5 $\mu$ L (Prazosin + NOR + Pilo  $223,6 \pm 35,8$  mg/7min, versus Saline + NOR + Pilo  $256,0 \pm 58,5$  mg/7min). The results show that the noradrenaline injected in the APM reduces the peripheral pilocarpine-induced salivation and this effect is reduced by the previous

blockade of the receiving adrenergics  $\alpha_2$  of the same area, suggesting to the existence of an adrenergic  $\alpha_2$  inhibitory mechanism of the salivation in the APM.

## INTRODUÇÃO

A cavidade bucal está relacionada com diversas atividades fisiológicas dos mamíferos, entre elas a mastigação, deglutição, fonação e gustação. A saliva, secretada constantemente nesta cavidade, é de fundamental importância para a manutenção da saúde bucal atuando em fatores tais como tamponamento do pH, remineralização dental e prevenção de infecções. A secreção salivar atua ainda no controle de outras variáveis fisiológicas e comportamentais como a termorregulação e ingestão de sódio (Flynn et al., 1981; Matsuo e Yamamoto, 1989; Jensen et al., 1991; Ferguson, 1993; Freitas et al., 1994). Pacientes com diminuição de secreção salivar (com xerostomia) total ou parcial devido à radiação da região da face, com exocrinopatia como a síndrome de Sjögren, desidratados, sob o uso excessivo de diuréticos ou de drogas anticolinérgicas ou antiadrenérgicas, exibem sinais e sintomas como boca seca, queimação da mucosa bucal, diminuição de acuidade gustatória, dificuldade de alimentação, desconforto ao falar, aumento no índice de cáries, doenças periodontais, intolerância à prótese total e sialodente bacteriana (Ferguson, 1993; Wiseman e Faulds, 1995). Devido a esses efeitos indesejáveis e desagradáveis, a correção ou redução desses problemas com o uso de substâncias que estimulam a secreção salivar como a pilocarpina, tem, portanto, interesse clínico e farmacológico.

As glândulas salivares são por definição as glândulas que despejam seus produtos de secreção (saliva) na cavidade bucal. Na maioria dos mamíferos, inclusive no homem, são três os pares de glândulas salivares maiores. As parótidas, que se localizam na face, anteriormente ao canal auditivo e articulação têmporo-mandibular, as submandibulares, localizadas medialmente ao ramo da mandíbula e as sublinguais,

que ocupam o espaço abaixo do assoalho da cavidade bucal, anteriormente às glândulas submandibulares. No rato, as submandibulares estão em íntima relação com as sublinguais compartilhando da mesma cápsula externa. Além destas, existem várias glândulas salivares menores que estão espalhadas pelos lábios, palato, língua e mucosa bucal (Garret e Anderson, 1991; Saracco e Crabill, 1993).

As glândulas salivares recebem inervação do sistema nervoso autonômico (Norberg e Olsson, 1985; Garret, 1966; Emmelin, 1987; Garret e Anderson, 1991). No rato, a inervação parassimpática é dada pelos neurônios dos nervos corda do tímpano (ramo do nervo facial) que inervam as glândulas submandibular-sublingual e pelo ramo timpânico do glossofaríngeo que inerva a glândula parótida (Hellekant e Hagstrom, 1974; Templeton e Thulin, 1978; Loewy, 1990; Garret e Anderson, 1991). Os corpos celulares desses nervos estão alojados, respectivamente, nos núcleos salivatórios superior e inferior, que se estendem da parte caudal da ponte à parte anterior do bulbo (Hellekant e Hagstrom, 1974; Nicholson e Severin, 1981; Ramos et al. 1988 a, b, 1989; Takeuchi et al., 1991). A inervação simpática parte dos segmentos torácicos superiores e prossegue via nervo cervical simpático superior até o gânglio cervical simpático superior, onde faz sinapse, prosseguindo então pelas fibras eferentes até as glândulas submandibular-sublingual e parótida, respectivamente (Elverdin et al., 1984; Moreno et al., 1986; Loewy, 1990; Garret e Anderson, 1991). As terminações nervosas parassimpáticas são mais abundantes nas glândulas submandibulares, ao passo que as parótidas recebem poucas fibras dessa natureza (Garret, 1966), o que sugere que as glândulas submandibulares são mais importantes para a secreção aquosa. Esse tipo de produção de saliva envolve o movimento de água dos capilares

para as células acinares e depois para o lúmen glandular (Anderson et al. 1995).

A importância do simpático e do parassimpático na regulação do fluxo sanguíneo foi estabelecida há bastante tempo (Bernard, 1858; Heidenhain, 1872). O fluxo sanguíneo nas glândulas salivares está sob controle do sistema nervoso neurovegetativo (Anderson et al., 1998). É bem conhecido que a vasodilatação e o aumento de fluxo sanguíneo são fundamentais para atender o aumento no volume de secreção salivar (Anderson et al., 1998).

Um dos principais estados fisiológicos no qual a inervação para as glândulas salivares é ativada é o reflexo relacionado com a ingestão alimentar (Bradley, 1991). Impulsos aferentes de mecanorreceptores orais e botões gustativos são transmitidos por fibras sensoriais dos nervos trigêmeo, facial e glossofaríngeo ao núcleo trigeminal e núcleo do trato solitário (Bradley, 1991). Além disto, a ativação da inervação simpática para as glândulas salivares potencia a secreção salivar induzida pela ativação do reflexo relacionado com a ingestão alimentar (Izumi e cols., 1995).

Apesar de provável secreção espontânea pelas glândulas salivares (Ohlin e Perek, 1965; Templeton e Thulin, 1978; Garret e Anderson, 1991), a saliva é, reconhecidamente, secretada por ativação de receptores autonômicos glandulares. A ativação farmacológica de receptores adrenérgicos e colinérgicos localizados nas glândulas salivares promove um aumento da secreção salivar (Norberg e Olson, 1965; Martinez e Cassity, 1983; Elverdin et al., 1984; Baum, 1987; Jensen et al., 1991; Izumi e Karita, 1995; Mandel et al., 1968; Emmelin, 1987; Garret, 1987; Parkinson, 1990; Izumi e Karita, 1994; Hiramatsu et al., 1995). Tanto com estímulos simpáticos como parassimpáticos, as glândulas irão responder com secreção, embora a qualidade

e a quantidade dessas secreções, nessas duas condições, sejam diferentes (Elverdin et al., 1984 Emmelin, 1987; Garret, 1987). Os receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  parecem ser os principais mediadores da secreção de proteína nos ductos (Garret et al., 1991), enquanto que os receptores  $\beta$  são os principais mediadores da secreção de proteína nos ácinos (Garret et al., 1991). Os receptores muscarínicos têm função importante na secreção de líquido, resultando em grande volume de saliva secretada, porém com baixa concentração protéica (Garret et al., 1987).

Diante disso, tem-se então que a ativação simpática causa vasoconstrição na artéria que irriga a glândula salivar, secreção pelas células acinares e contração das células mioepiteliais, resultando em pequeno volume de secreção, mas rico em proteínas (Garret, 1987; Bradley, 1991); e a ativação da inervação parassimpática para as glândulas causa vasodilatação, secreção aquosa em grande quantidade pelas células acinares e contração das células mioepiteliais resultando em grande volume, porém com baixa concentração de proteínas (Garret, 1987; Bradley, 1991; Izumi et al., 1994).

A pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico inicialmente extraído da planta brasileira *Pilocarpus jaborandi*, age sobre as glândulas salivares e sudoríparas, produzindo vasodilatação das artérias que irrigam as glândulas e conseqüente salivação e sudorese (Fergusson, 1993). Embora uma ação direta da pilocarpina em receptores localizados nas glândulas salivares, estimulando a secreção salivar, seja um mecanismo bastante aceitável e que parece mais adequado, estudos mais recentes têm demonstrado que grande parte da salivação induzida pela injeção, mesmo periférica, de pilocarpina depende de mecanismos encefálicos.

Renzi e cols., (1993) investigaram os efeitos da injeção de pilocarpina no sistema nervoso central (SNC) sobre a salivação e verificaram que a injeção desta droga no ventrículo lateral de ratos causa hipersecreção salivar dependente principalmente de receptores muscarínicos do tipo M<sub>1</sub> centrais. A salivação induzida por injeção intracerebroventricular (icv) bem como intraperitoneal (ip) de pilocarpina é inibida pela lesão eletrolítica de tecido cerebral situado na região preoptico-periventricular (região anteroventricular do terceiro ventrículo-AV3V) (Renzi e cols., 1993), sugerindo a participação de estruturas cerebrais na salivação induzida por estimulação colinérgica central e periférica (Renzi e cols., 1993).

Exemplos disso são experimentos em que se verificou que a salivação induzida pela pilocarpina injetada icv pode ser inibida pela lesão de estruturas encefálicas como a região AV3V, área septal (AS) ou hipotálamo lateral (HL), sugerindo que estas estruturas estariam envolvidas no controle da salivação (Renzi e cols., 1993, 1994 e 2002). Schallert e cols (1978) demonstraram que após a lesão HL, há modificações na quantidade de saliva secretada, sendo que, logo após, há uma hipersalivação e posteriormente uma redução na quantidade de saliva, abaixo dos níveis normais. Vale ressaltar também que as injeções periféricas do bloqueador ganglionar hexametônio ou de antagonistas adrenérgicos, reduzem a salivação produzida pela injeção icv de pilocarpina, sugerindo, também, a participação do sistema simpático nos efeitos da pilocarpina na secreção salivar (Cecanho et al., 1999).

Estudos do nosso laboratório mostraram o envolvimento do sistema nervoso central, particularmente da região AV3V, na secreção salivar induzida pela injeção de

pilocarpina central ou periférica em ratos. Em animais em que se realizou a lesão aguda da região AV3V (6 horas, 2 e 7 dias), a secreção salivar induzida pela injeção intraperitoneal (ip) ou icv de pilocarpina foi reduzida, ao passo que em animais com lesão crônica dessa região (15 dias), não foi observada alteração na salivação induzida pela injeção ip ou icv de pilocarpina. Esses resultados demonstram que a região AV3V é importante para o efeito salivatório da pilocarpina e sugere que, ao menos uma parte do efeito da injeção periférica de pilocarpina sobre a secreção salivar depende da ativação de mecanismos centrais. Além disso, mudanças morfológicas nas glândulas salivares também foram induzidas pela lesão da região AV3V, embora seu início apareceu somente 2 dias depois da lesão ter sido feita e se tornou mais evidente aos 7 e aos 15 dias depois (Renzi et al., 1990). Aparentemente, as alterações funcionais não são necessariamente conseqüências das alterações morfológicas das glândulas salivares.

A recuperação da secreção salivar após um período crônico de lesão da região AV3V pode ser devido à supersensibilidade da glândula salivar a pilocarpina, semelhante à sensibilidade observada na desnervação glandular (Emmelin e Muren, 1950; Emmelin, 1987). Outra possível explicação para a recuperação da secreção salivar após a lesão da região AV3V seja o fenômeno da plasticidade neural, já que o controle exercido pela região AV3V desaparece imediatamente após a lesão, mas alguns dias depois outras áreas cerebrais poderiam reorganizar essa função. A recuperação da função alguns dias após a lesão da região AV3V em ratos também foi demonstrada para ingestão de água e sódio. (Brody e Johnson, 1978; Gonçalves et al., 1992). Diante disso, pode-se sugerir um possível envolvimento de mecanismos

centrais na secreção salivar induzida por ativação colinérgica em ratos, já que a lesão da região AV3V reduziu a secreção salivar induzida pela injeção ip ou icv de pilocarpina, antes mesmo de aparecer alterações morfológicas nas glândulas submandibulares.

Para evidenciar a importância das áreas anteriores do encéfalo, podemos citar os resultados de estudos neuroanatômicos que mostraram que existem conexões entre estruturas da lâmina terminalis (área preóptica medial-APM, órgão vasculoso da lâmina terminal-OVLT e órgão subfornical-OSF) e as glândulas salivares, o que corrobora a participação central na regulação da secreção salivar (Hübschle, 1998).

Kanosue (1990) demonstrou que a estimulação térmica bilateral da área preóptica medial e do hipotálamo anterior, promove aumento da secreção salivar. Este mesmo autor observou também que a estimulação elétrica da área preóptica medial produziu um aumento na secreção salivar das glândulas submandibular/sublingual. Esses mesmos resultados mostraram que a estimulação térmica ou elétrica, unilateral da área preóptica medial (APM) produz significativo aumento de secreção das glândulas submandibulares e sublinguais ipsilaterais quando comparado com a secreção das glândulas salivares contralaterais.

Estudos mostraram que a pilocarpina também poderia ser indicada para atenuar os efeitos colaterais de drogas adrenérgicas anti-hipertensivas que ao reduzir a secreção salivar, causam desconforto e sensação de boca seca (Fergusson, 1993). Uma droga anti-hipertensiva adrenérgica típica é a clonidina (agonista de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  e imidazólicos) que apresenta a xerostomia como um dos efeitos colaterais. Injetada centralmente ou periféricamente, a clonidina possui efeito

inibitório sobre a secreção salivar (Izumi e cols., 1995). O mecanismo de ação central da clonidina, responsável pela redução da salivação, ainda é desconhecido. O efeito periférico da clonidina é atribuído a sua ação em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  pré-sinápticos da terminação simpática das glândulas salivares (Izumi e cols., 1995).

Uma nova droga com potente efeito central anti-hipertensivo, semelhante a clonidina, é a moxonidina (Ernsberger e cols., 1993; 1994; Haxhiu e cols., 1994). Embora tenha alguma atividade em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , acredita-se que a moxonidina atue, preferencialmente, em receptores imidazólicos do tipo II, localizados na região rostroventrolateral do bulbo (RVL). Estes receptores, quando ativados, promovem uma diminuição da atividade neuronal deste núcleo, suprimindo a atividade simpática eferente, e conseqüentemente, reduzindo a resistência vascular periférica total e a pressão arterial. Como a moxonidina possui uma fraca ação em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  é possível que ela tenha um efeito menor sobre a secreção salivar em comparação com a clonidina ou mesmo não apresente o efeito colateral de xerostomia. Entretanto, recentes resultados mostraram que a moxonidina injetada icv tem um potente efeito inibitório sobre a salivação induzida pela pilocarpina injetada ip ou icv (Moreira e cols., 2001). Efeito semelhante também foi observado em animais que receberam injeção icv do agonista adrenérgico noradrenalina associado com pilocarpina ip ou icv (Moreira e cols., 2002). O tratamento prévio com ioimbina ou RX-821002 (antagonistas de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ ) icv aboliu o efeito anti-salivatório da moxonidina e da noradrenalina injetada centralmente, já o antagonista adrenérgico  $\alpha_1$  prazosin, injetado previamente não foi eficiente em inibir o efeito anti-salivatório da noradrenalina, sugerindo o envolvimento de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$

na inibição da salivação (Takakura e cols., 2003; Moreira e cols., 2002). A injeção ip de moxonidina na mesma dose injetada icv, porém, não modificou a salivação produzida pela pilocarpina injetada perifericamente. Por outro lado, a injeção ip de noradrenalina reduziu a salivação induzida por pilocarpina, mas seu efeito inibitório não foi revertido com a injeção icv de ioimbina ou RX-821002, sugerindo que a noradrenalina injetada perifericamente não atua em receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  centrais para inibir a salivação induzida por pilocarpina (Takakura e cols., 2001).

A inibição da salivação pela ativação dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  centrais poderia ser devido a pelo menos dois mecanismos: 1º) ativação de uma via inibitória neural para as glândulas salivares; 2º) inibição de uma via excitatória central que ativaria a salivação. A hipótese de o primeiro mecanismo ser o responsável pelos efeitos inibitórios da moxonidina e da noradrenalina parece pouco provável, uma vez que não existe nenhuma evidência da existência de uma via inibitória direta do SNC para as glândulas salivares (Emmelin, 1987; Garrett, 1987). Portanto, o segundo mecanismo, no qual a pilocarpina agiria diretamente no SNC ativando uma via excitatória que promoveria salivação parece ser o mais provável. A atuação no sistema nervoso central da moxonidina e da noradrenalina seria no sentido de inibir essa via excitatória central ativada pela pilocarpina. Esses mecanismos de ação propostos para a pilocarpina e para os agonistas adrenérgico  $\alpha_2$  também estão de acordo com os resultados anteriores deste laboratório, que mostraram que lesões de algumas áreas cerebrais prosencefálicas (região AV3V, HL e AS) produzem grande redução da salivação induzida pela pilocarpina injetada central ou perifericamente

(Renzi e cols., 1993; 1994 e 2002).

A existência da neurotransmissão noradrenérgica na área preóptica medial (APM) foi constatada em outros parâmetros fisiológicos, como por exemplo, sono e temperatura corporal (Raesh e Kumar, 1998; Alam e Mallick, 1994) e ainda na regulação da concentração de receptores andrógenos (Handa e Resko, 1989). Com base nestes dados, este projeto propõe investigar na salivação, os efeitos da injeção de agonistas e antagonistas adrenérgicos na APM, associada à injeção periférica de pilocarpina em ratos. Assim, nossa hipótese é que a mesma via neural que é destruída pelas lesões das regiões AV3V, HL e AS, poderia ser inibida pela ativação dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  centrais, resultando em inibição semelhante da salivação.

## OBJETIVOS

Diante disso, sabendo-se do envolvimento do mecanismo de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ , bem como da participação de estruturas encefálicas no controle da secreção salivar, constituem-se objetivos deste trabalho:

- Avaliar os efeitos agudos (24 horas e 5 dias) ou crônicos (15 dias) da lesão eletrolítica da APM na salivação basal e na salivação induzida pela injeção ip de pilocarpina em ratos.
- Analisar os efeitos da injeção de noradrenalina na APM sobre a salivação induzida pela injeção ip de pilocarpina em ratos.
- Investigar os efeitos da injeção de noradrenalina sozinha ou combinada com antagonistas de receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  (Prazosin) ou  $\alpha_2$  (RX-821002) na APM sobre a salivação induzida pela injeção ip de pilocarpina em ratos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Animais:**

Foram utilizados ratos Holtzman com peso variando de 280 a 320 g, procedentes do Biotério do Campus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável e alimentados com ração sólida e água de torneira, com temperatura controlada a 24°C e umidade em 55% e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

### **2. Técnica de lesão eletrolítica da APM:**

Os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). Após a incisão longitudinal da pele e do tecido subcutâneo da cabeça, o periósteo foi afastado, as suturas de bregma e lambda foram expostas, e serviram como referência para nivelamento da cabeça do animal. Determinado o ponto de introdução do eletrodo, foi executada a trepanação da abóbada com auxílio de uma broca esférica, tomando-se o cuidado para evitar lesão do seio venoso longitudinal. Através desse orifício, após o afastamento cuidadoso do seio venoso longitudinal com auxílio de uma agulha hipodérmica, foi introduzido um eletrodo de aço inoxidável de 0,45 mm de diâmetro, isolado em toda extensão, exceto 0,5 mm da extremidade. A localização da extremidade do eletrodo foi obtida com os parâmetros estereotáxicos do Atlas de

Paxinos e Watson (1986). Para a lesão da APM foram utilizados os parâmetros: AP = 0,0 mm caudal ao bregma; L =  $\pm 0,7$  mm do seio venoso; V = 7,7 mm abaixo da superfície do osso. As lesões foram efetuadas pela passagem de uma corrente elétrica anódica de 1 mA. Essa corrente foi passada 3 vezes com duração de 10 segundos cada, usando-se uma fonte de corrente contínua, que permite a regulação eletrônica desses parâmetros.

Um outro grupo de animais (lesão fictícia) foi submetido aos mesmos procedimentos de cirurgia cerebral a que foram submetidos os animais lesados, exceto que não foram expostos à passagem de corrente elétrica.

Uma dose profilática de penicilina (50.000 UI) foi injetada intramuscularmente ao término da cirurgia em todos os animais.

### **3. Técnica de implante de cânulas guias cerebrais:**

Os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para nivelar a cabeça dos animais. Utilizando-se o bregma foram determinados os parâmetros para a introdução de cânulas guias, de aço inoxidável, em direção à área preóptica medial (APM).

Para o implante de cânulas em direção a APM, utilizaram-se as seguintes coordenadas: AP = 0,3 mm caudal ao bregma; L = 0,6 mm do seio venoso e V = 5,9 mm abaixo da superfície do crânio.

A cânula-guia foi fixada à superfície do crânio por meio de acrílico autopolimerizável preso a dois parafusos atarraxados no crânio. Uma dose profilática de antibiótico (penicilina 50.000 UI) foi injetada intramuscularmente ao término da cirurgia em todos os animais.

#### **4. Injeção cerebral:**

As injeções na APM foram feitas com uma seringa Hamilton (5 µL) conectada por meio de um tubo de polietileno (PE 10), a uma cânula injetora de aço inoxidável com 2 mm de comprimento maior que a cânula guia.

As drogas foram dissolvidas em solução fisiológica e o volume injetado na APM foi de 0,5µL.

#### **5. Coleta da Saliva:**

Após 5 dias da cirurgia de implante de cânula cerebrais, os ratos foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg de peso corporal) e o grau de anestesia foi monitorado pela observação do reflexo córneo palpebral (de piscar). Doses suplementares de anestésico foram administradas sempre que necessário. Após secar-se a cavidade oral do animal com algodão, iniciou-se a coleta da saliva com o auxílio de pequenas bolas de algodão previamente pesadas e colocadas nas porções laterais e dorso-pósterio-lingual. A coleta da saliva foi realizada durante 7 minutos iniciando-se 10 minutos após a injeção de pilocarpina. Para o registro da salivação basal, a coleta da saliva durou 7 minutos iniciando-se após a secagem da cavidade oral do animal.

## **6. Drogas:**

As drogas injetadas foram:

- Cloridrato de pilocarpina (Sigma, USA): agonista colinérgico muscarínico, utilizado na dose de 1 mg/ml/kg de peso corporal para injeções ip.
- Bitartarato de noradrenalina (Sigma, USA): agonista adrenérgico, utilizado nas doses de 80 e 160 nmol/0,5  $\mu$ L para injeções na APM.
- RX-821002 (Sigma, USA): antagonista adrenérgico  $\alpha_2$ , utilizado nas doses de 80, 160 e 320 nmol/0,5  $\mu$ L para injeções na APM.
- Cloridrato de prazosin (Sigma, USA): antagonista adrenérgico  $\alpha_1$ , utilizado na dose de 160 nmol/0,5  $\mu$ L para injeções na APM.

## **7. Histologia:**

Após os experimentos, os animais foram perfundidos com formalina 10% através do ventrículo cardíaco esquerdo, sob anestesia profunda com tiopental de sódio (60 mg/kg de peso corporal).

Os cérebros foram retirados, fixados em formalina 10%, cortados em micrótomo de congelamento, em cortes de 50  $\mu$ m de espessura, corados pelo método de Giemsa e analisados ao microscópio para localização da injeção cerebral.

Apenas os animais com lesão na APM e implante na APM tiveram os resultados analisados.

## **8. Análise Estatística:**

Os resultados foram tabelados e representados em gráficos como média  $\pm$  erro padrão da média. O teste de Student-Newmann-Keuls precedido de análise de variância foi usado para comparação entre as médias. O nível de significância foi fixado em  $p < 0,05$ .

## **EXPERIMENTOS QUE FORAM REALIZADOS:**

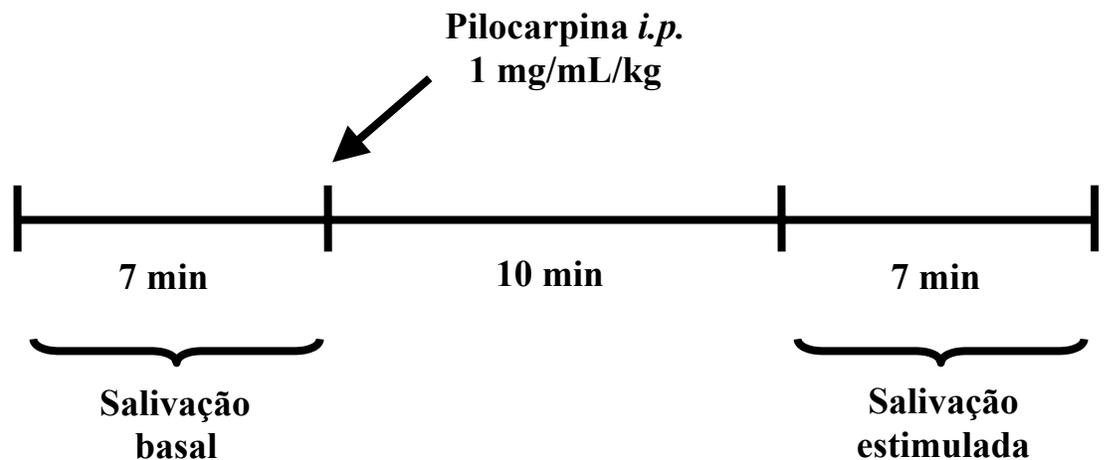
**1. Efeitos da lesão eletrolítica da APM feita 24 horas e 5 dias antes do experimento (período agudo) que avaliou a salivação induzida por pilocarpina ip.**

Foram utilizados 4 grupos de ratos, sendo 2 grupos com lesão da APM e outros 2 grupos com lesão fictícia. Nos 4 grupos foram coletadas a saliva total basal (controle) e a induzida pela injeção ip de pilocarpina 24 horas e 5 dias após a lesão eletrolítica.

**2. Efeitos da lesão eletrolítica da APM feita 15 dias antes do experimento (período crônico) que avaliou a salivação induzida por pilocarpina ip.**

Foram utilizados 2 grupos de ratos, sendo 1 grupo com lesão da APM e outro grupo com lesão fictícia. Nos 2 grupos foram coletadas a saliva total basal (controle) e a induzida pela injeção ip de pilocarpina 15 dias após a lesão eletrolítica.

Os experimentos foram realizados conforme protocolo abaixo:

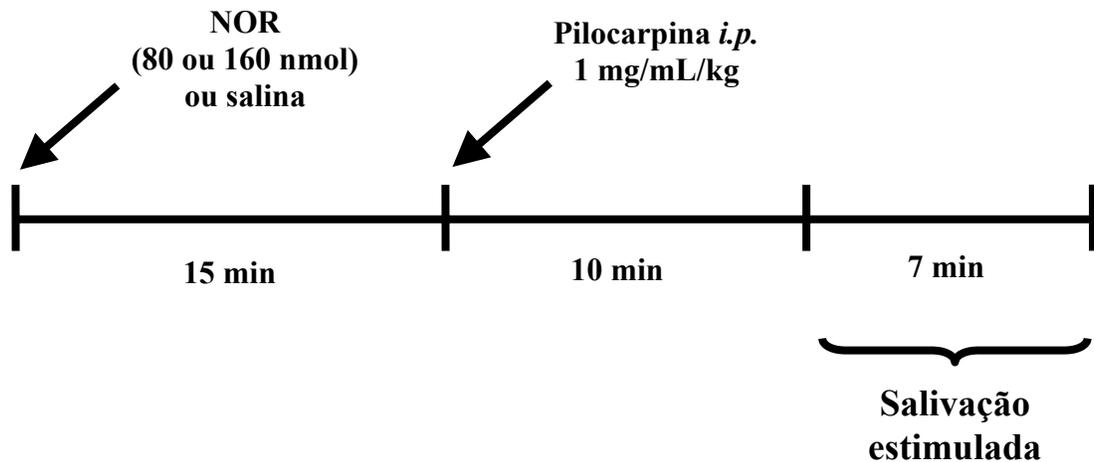


### 3. Efeitos da injeção na APM de noradrenalina sobre a salivação induzida por pilocarpina ip.

A salivação foi induzida pela injeção ip de pilocarpina (1mg/ml/kg de peso corporal) aplicada 15 minutos após a injeção na APM de noradrenalina (80 e 160 nmol/ 0,5 µl) ou salina. A coleta da saliva iniciada 10 minutos após a injeção de pilocarpina ip foi realizada durante 7 minutos.

Nos estudos com noradrenalina na APM, cada dose dessa droga, foi injetada em um grupo de animais. Cada grupo de animais foi submetido a dois experimentos com um intervalo de pelo menos três dias entre eles, sendo que no primeiro experimento uma parte dos animais recebeu injeções de noradrenalina antes da injeção de pilocarpina, e outra parte recebeu injeções de veículo antes da pilocarpina. No experimento seguinte, nos mesmos animais, o protocolo foi invertido de maneira

contrabalaneada. Como controle, uma terceira parte dos animais foi tratada com veículo + pilocarpina em cada experimento, conforme protocolo abaixo:



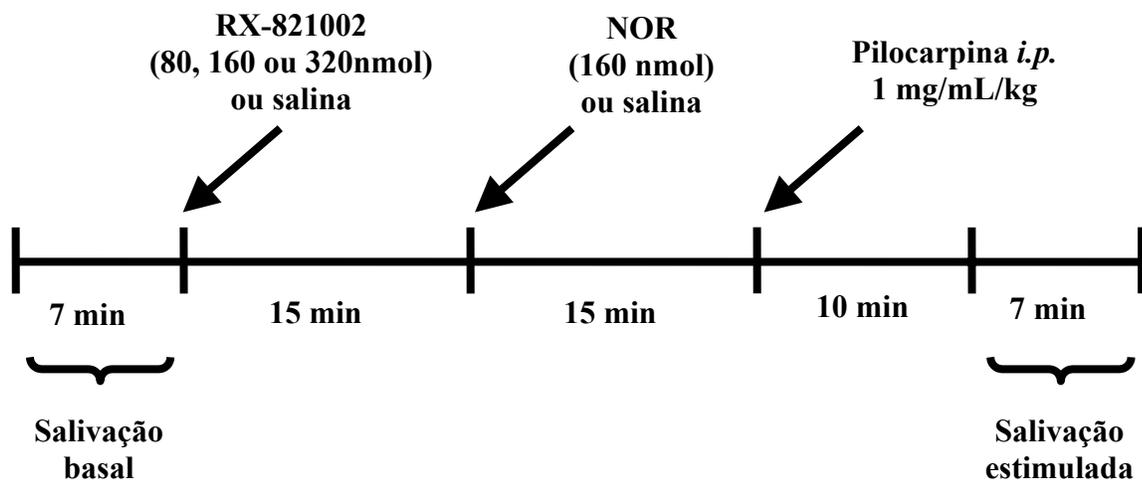
#### **4. Efeitos da associação de Prazosin e noradrenalina injetadas na APM na salivação induzida por pilocarpina *ip*.**

A salivação foi induzida pela injeção *ip* de pilocarpina (1mg/ml/kg de peso corporal) aplicada 15 minutos após a injeção na APM de noradrenalina (160 nmol/ 0,5  $\mu$ l). Prazosin (160 nmol/ 0,5  $\mu$ l) ou salina foram injetados na APM 15 minutos antes da injeção de noradrenalina. A coleta da saliva iniciada 10 minutos após a injeção de pilocarpina foi realizada durante 7 minutos.

## **5. Efeitos da associação de RX-821002 e noradrenalina injetadas na APM na salivação induzida por pilocarpina ip.**

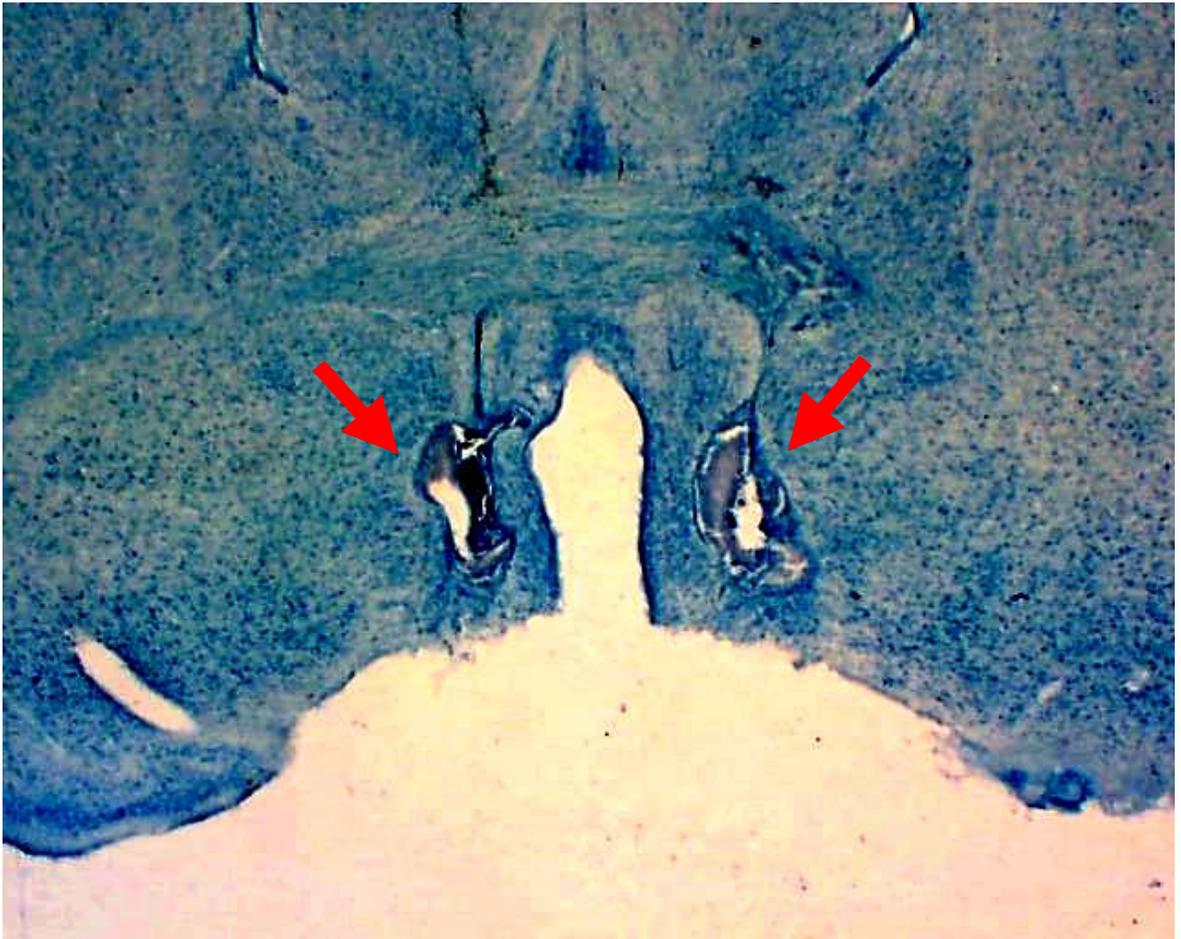
A salivação foi induzida pela injeção ip de pilocarpina (1mg/ml/kg de peso corporal) aplicada 15 minutos após a injeção na APM de noradrenalina (160 nmol/ 0,5 µl). RX-821002 (80; 160 e 320 nmol/ 0,5 µl) ou salina foram injetados na APM 15 minutos antes da injeção de noradrenalina. A coleta da saliva iniciada 10 minutos após a injeção de pilocarpina foi realizada durante 7 minutos.

No grupo de animais em que se estudou os efeitos do antagonista adrenérgico  $\alpha_2$  RX-821002 e do antagonista adrenérgico  $\alpha_1$  Prazosin, os animais também foram submetidos a dois experimentos com um intervalo de pelo menos 3 dias entre eles. No primeiro experimento, uma parte dos animais recebeu injeção de veículo + noradrenalina + pilocarpina e outra parte recebeu injeção de RX-821102 ou Prazosin + noradrenalina + pilocarpina. No experimento seguinte, nos mesmos animais, o protocolo foi invertido, de maneira contrabalanceada. Como controle, uma terceira parte dos animais foi tratada com veículo + pilocarpina em cada experimento, conforme protocolo abaixo:



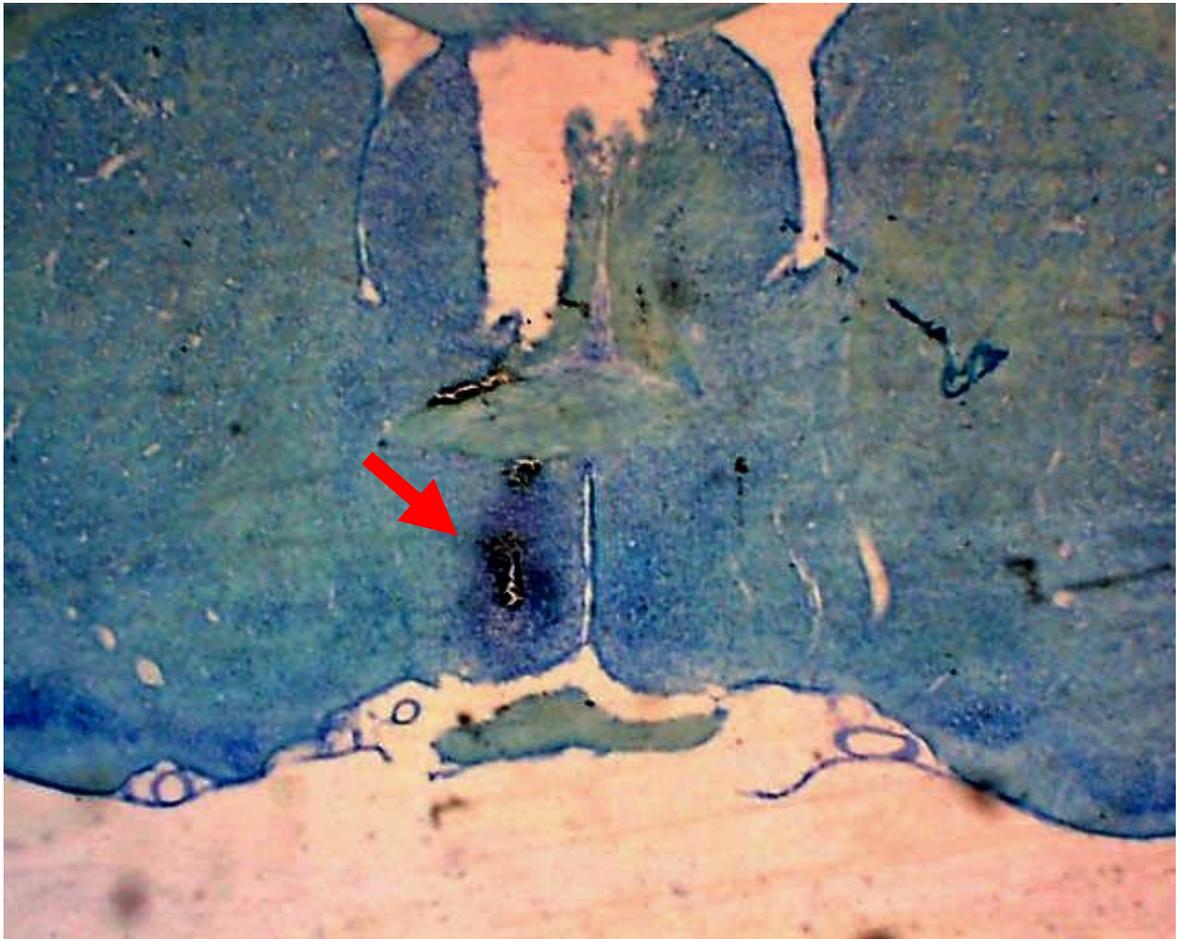
## HISTOLOGIA

A Figura 1 mostra a microscopia de um corte de cérebro de rato que sofreu lesão da APM. Apenas os animais que tiveram a lesão bilateral da APM comprovada foram considerados para análise dos resultados.



**FIGURA 1:** Corte histológico mostrando a lesão bilateral da APM (setas).

A Figura 2 mostra um corte de cérebro de rato que recebeu implante de cânula guia na APM. Apenas os animais que tiveram o implante na APM comprovado foram considerados para análise dos resultados.



**FIGURA 2:** Corte histológico mostrando o implante na APM (seta).

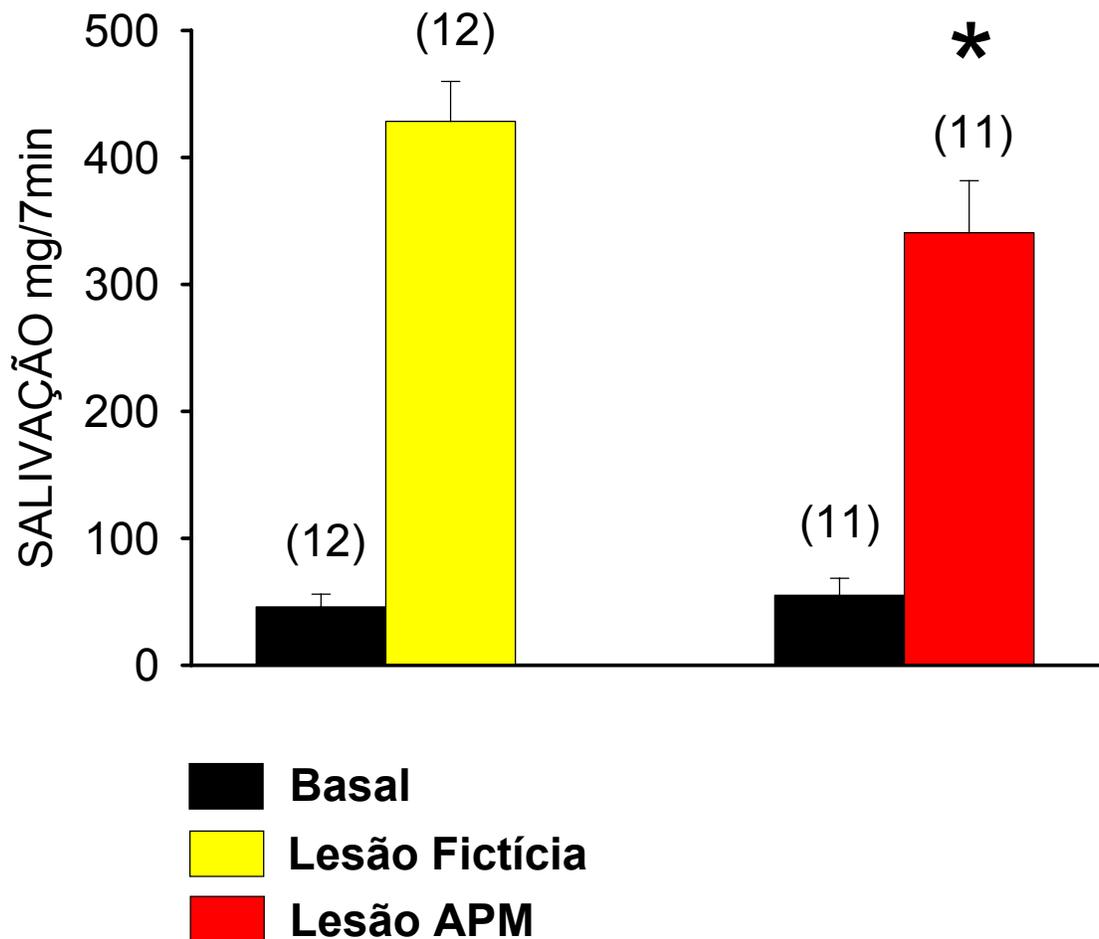
## **RESULTADOS**

### **1. Efeitos da lesão eletrolítica da APM feita 24 horas antes na salivação induzida por pilocarpina ip.**

A lesão da APM feita 24 horas antes do experimento não alterou a salivação basal dos ratos lesados (n=11) em relação aos ratos com lesão fictícia LF (n=12) conforme os resultados: lesão APM  $55,1 \pm 13,4$  mg/7min vs. LF  $45,9 \pm 10,0$ , no entanto produziu alteração significativa ( $p < 0,05$ ), reduzindo a salivação induzida por pilocarpina ip nos ratos lesados (n=11) em relação aos ratos com lesão fictícia LF (n=12). Os resultados foram: lesão APM  $340,7 \pm 41,1$  mg/7min, vs. LF  $428,4 \pm 31,6$  mg/7min (FIGURA 3).

## RATOS COM LESÃO NA APM DE 24 HORAS

\*  $p < 0,05$  quando comparado com lesão fictícia



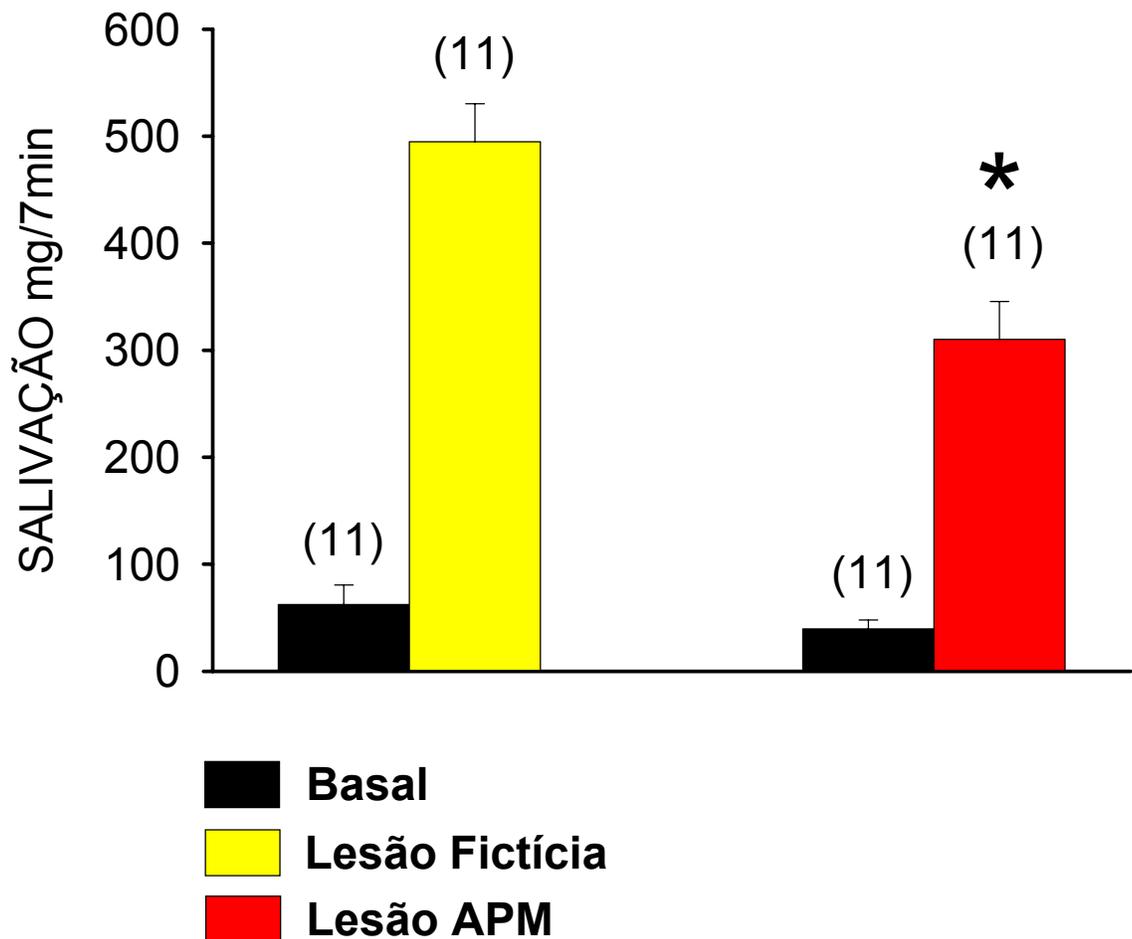
**FIGURA 3:** Secreção salivar basal e induzida por injeção ip de pilocarpina (mg/7min) em ratos que sofreram lesão da APM 24 horas antes do experimento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

## **2. Efeitos da lesão eletrolítica da APM feita 5 dias antes na salivação induzida por pilocarpina ip.**

A lesão da APM feita 5 dias antes do experimento não alterou a salivação basal dos ratos lesados (n=11) em relação aos ratos com lesão fictícia LF (n=11) segundo os resultados: lesão APM  $39,6 \pm 8,3$  mg/7min vs. LF  $62,3 \pm 18,3$ , no entanto produziu alteração significativa ( $p < 0,001$ ), reduzindo a salivação induzida por pilocarpina ip nos ratos lesados (n=11) em relação aos ratos com lesão fictícia LF (n=11). Os resultados foram: lesão APM  $310,2 \pm 35,4$  mg/7min, vs. LF  $494,9 \pm 35,5$  mg/7min (FIGURA 4).

## RATOS COM LESÃO NA APM DE 5 DIAS

\*  $p < 0,001$  quando comparado com lesão fictícia

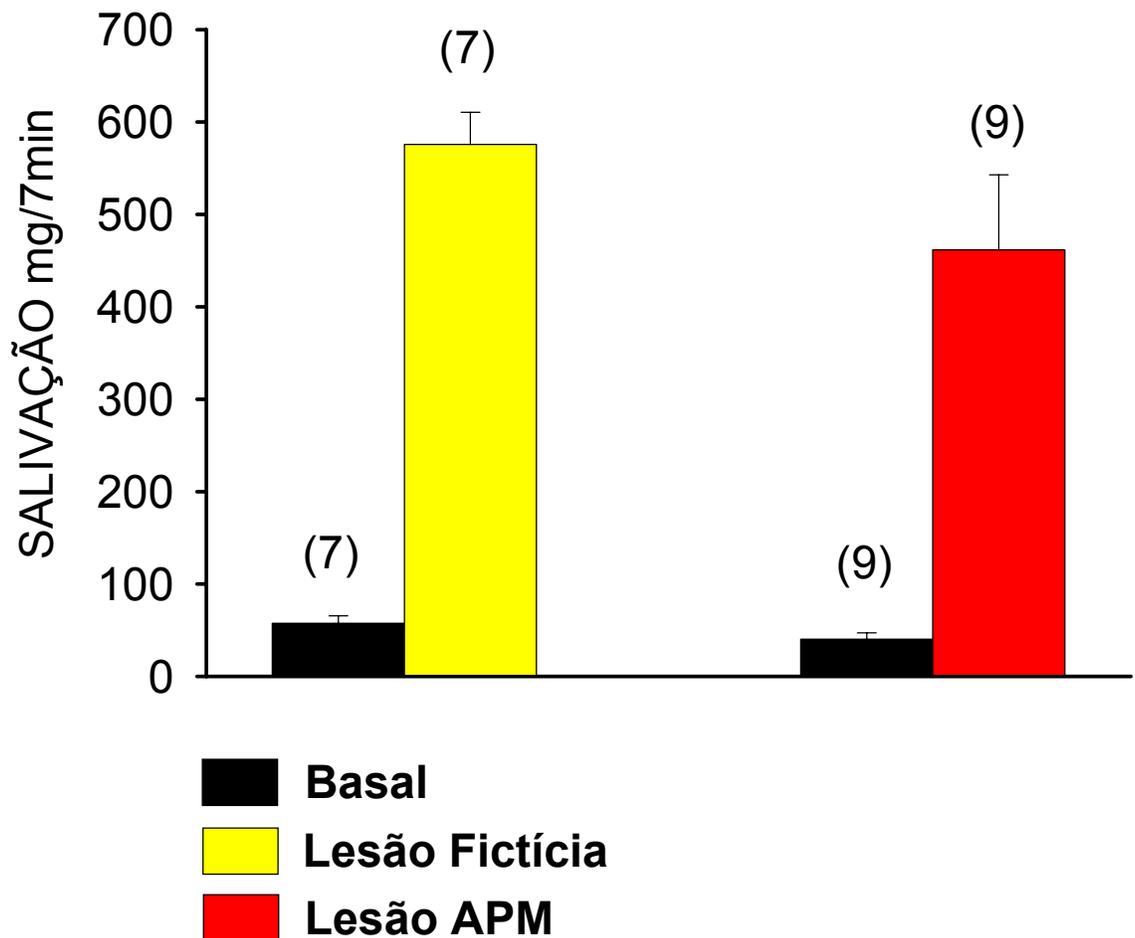


**FIGURA 4:** Secreção salivar basal e induzida por injeção ip de pilocarpina (mg/7min) em ratos que sofreram lesão da APM 5 dias antes do experimento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

### **3. Efeitos da lesão eletrolítica da APM feita 15 dias antes na salivação induzida por pilocarpina ip.**

A lesão da APM feita 15 dias antes do experimento não alterou a salivação basal dos ratos lesados (n=9) em relação aos ratos com lesão fictícia LF (n=7) segundo os resultados: lesão APM  $40,3 \pm 6,9$  mg/7min vs. LF  $57,5 \pm 8,0$ , e também não produziu alteração significativa na salivação induzida por pilocarpina ip nos ratos lesados (n=9) em relação aos ratos com lesão fictícia LF (n=7). Os resultados foram: lesão APM  $461,6 \pm 81,4$  mg/7min, vs. LF  $575,7 \pm 34,9$  mg/7min (FIGURA 5).

## RATOS COM LESÃO NA APM DE 15 DIAS



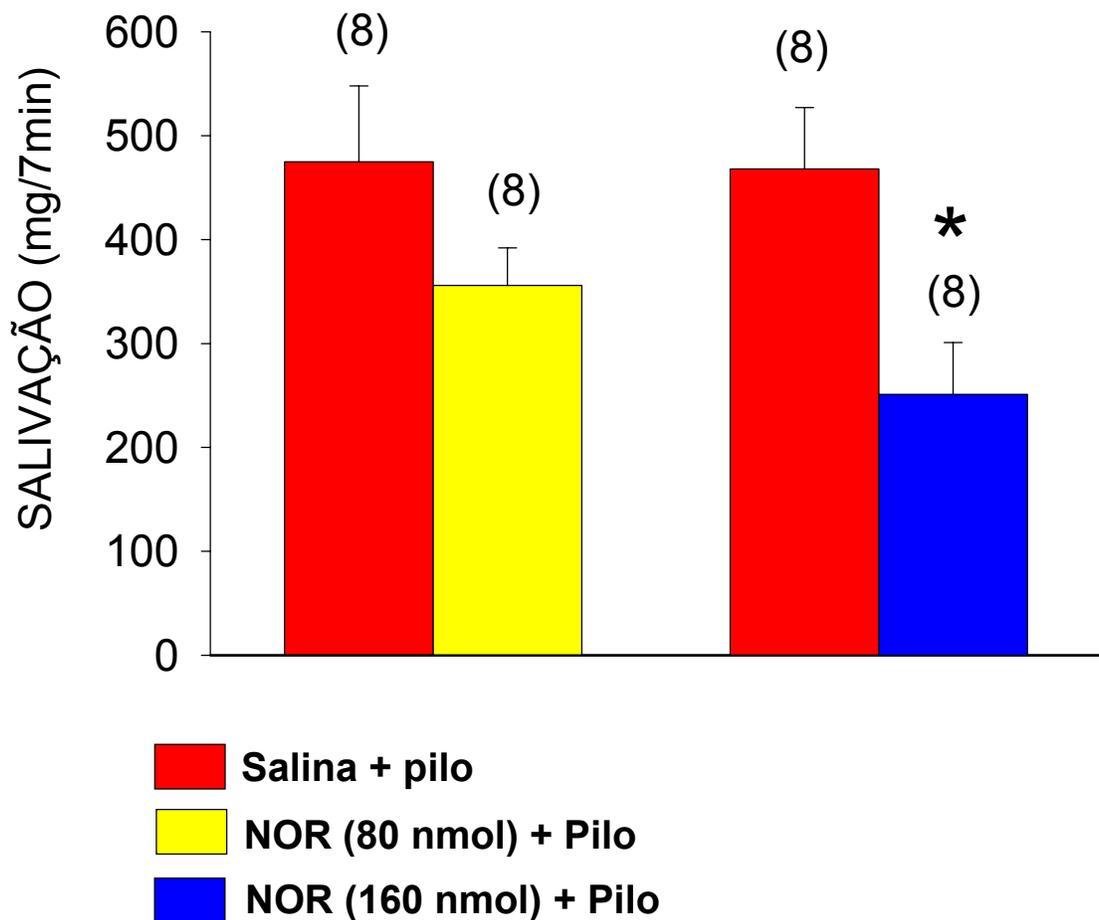
**FIGURA 5:** Secreção salivar basal e induzida por injeção ip de pilocarpina (mg/7min) em ratos que sofreram lesão da APM 15 dias antes do experimento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

#### **4. Efeitos da injeção de Noradrenalina nas doses de 80 e 160 nmol/0,5µL injetadas na APM na salivção induzida por pilocarpina ip.**

Noradrenalina na dose de 80 nmol/0,5 µL injetada na APM (n=8) não reverteu a salivção produzida pela injeção ip de pilocarpina (NOR + Pilo 356,0 ± 36,0 mg/7min vs. Salina + Pilo 475,0 ± 73,0 mg/7min). Noradrenalina na dose de 160 nmol/0,5 µL injetada na APM (n=8) reduziu a salivção (p<0,05) produzida pela injeção ip de pilocarpina (NOR + Pilo 251,0 ± 50,0 mg/7min vs. Salina + Pilo 468,0 ± 59,0 mg/7min) (FIGURA 6).

## SALIVAÇÃO DE RATOS COM IMPLANTE NA APM

\*  $p < 0,05$  quando comparado com salina + pilocarpina



**FIGURA 6:** Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de noradrenalina (NOR; 80 e 160 nmol) ou salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

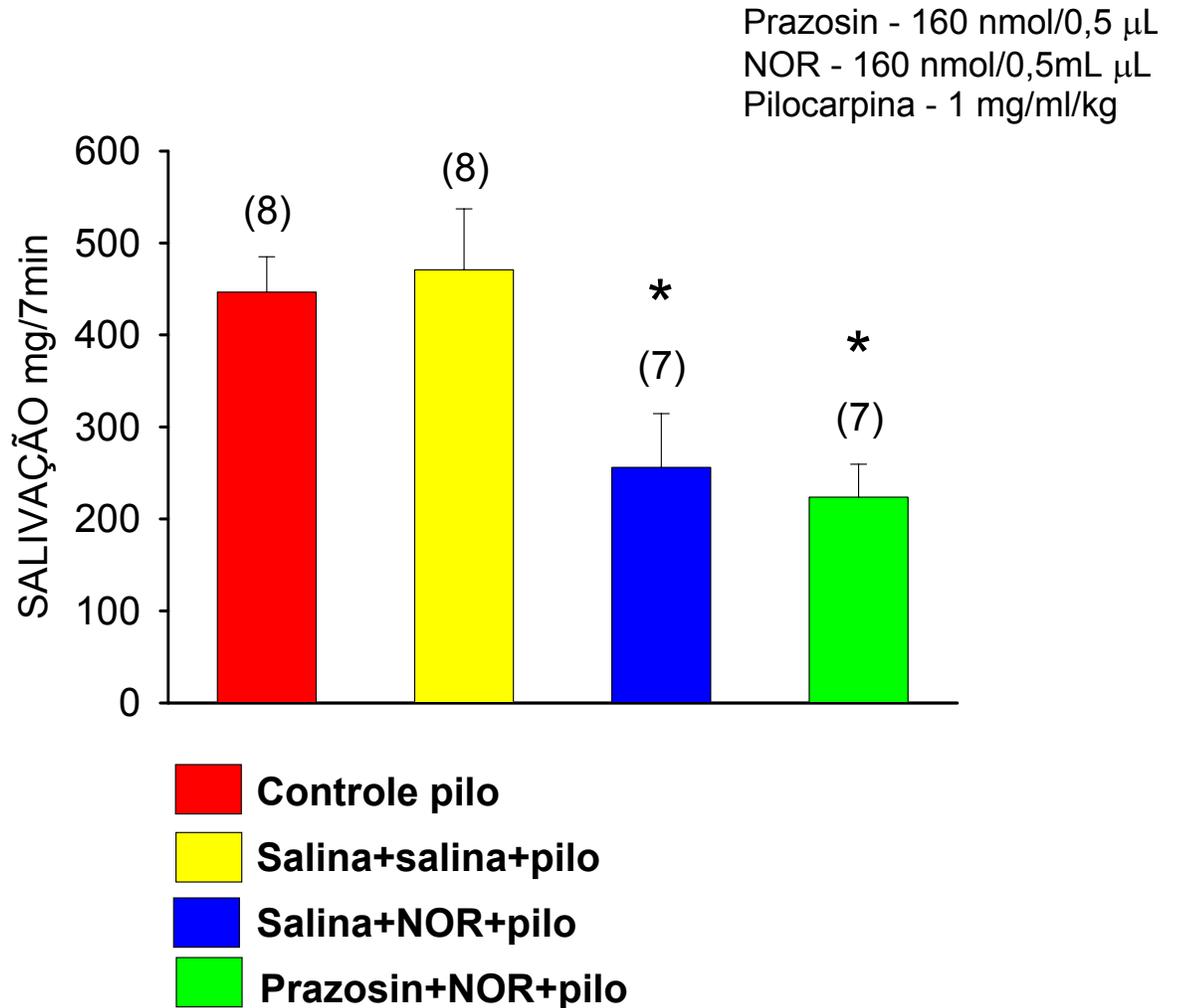
**5. Efeitos da associação de Prazosin na dose de 160 nmol/0,5µL e noradrenalina na dose de 160 nmol/0,5µL injetadas na APM na salivação induzida por pilocarpina ip.**

Prazosin na dose de 160 nmol/0,5µL injetada na APM (n=7) não aboliu a inibição produzida pela noradrenalina (n=7) na dose de 160 nmol/0,5 µL (Prazosin + NOR + Pilo  $223,6 \pm 35,8$  mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo  $256,0 \pm 58,5$  mg/7 min) também injetada na APM sobre a salivação induzida por pilocarpina ip, porém apresentou uma diferença significativa em relação aos grupos controle ( $p < 0,05$ ) (Prazosin + NOR + Pilo  $223,6 \pm 35,8$  mg/7 min, vs. Salina + Salina + Pilo  $470,9 \pm 66,2$  e Pilo  $446,7 \pm 38,4$  mg/7 min). O grupo que recebeu injeção de Salina + NOR + Pilo na APM obteve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle (Salina + NOR + Pilo  $256,0 \pm 58,5$  vs. Salina + Salina + Pilo  $470,9 \pm 66,2$  e Pilo  $446,7 \pm 38,4$  mg/7 min).

Os animais que receberam tratamento de Salina + Salina + Pilo (n=8) produziram salivação de  $470,9 \pm 66,2$  mg/7 min. Os animais que receberam tratamento somente com Pilo (n=8) produziram salivação de  $446,7 \pm 38,4$  mg/7min. Não ocorreu diferença entre estes grupos (FIGURA 7).

## SALIVAÇÃO DE RATOS COM IMPLANTE NA APM

\* $p < 0,05$  quando comparado com salina+salina+pilo e controle pilo



**FIGURA 7:** Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de Prazosin (Prazosin; 160 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

**6. Efeitos da associação de RX-821002 na dose de 80 nmol/0,5µL e noradrenalina na dose de 160 nmol/0,5µL injetadas na APM na salivação induzida por pilocarpina ip.**

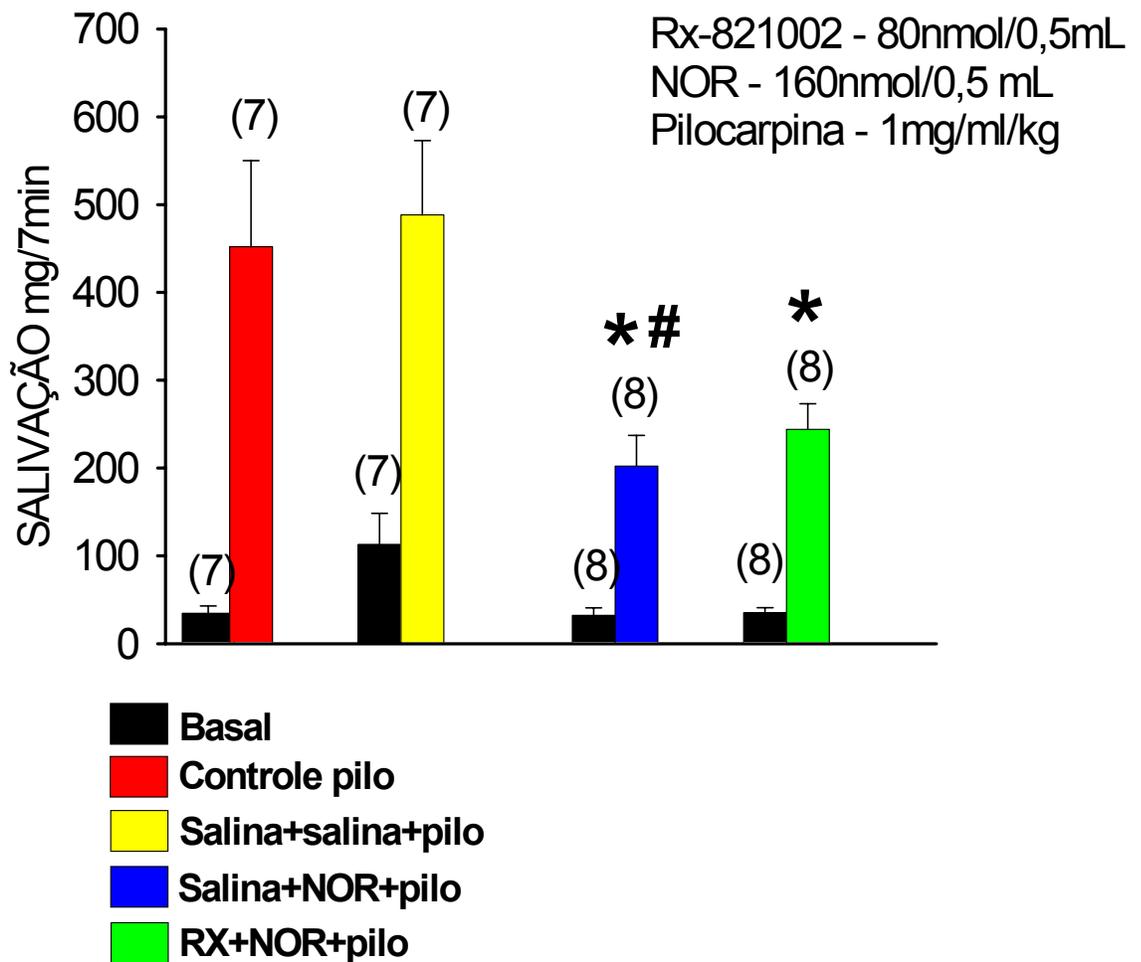
RX-821002 na dose de 80 nmol/0,5µL injetada na APM (n=8) não aboliu a inibição produzida pela noradrenalina (n=8) na dose de 160 nmol/0,5 µL (RX + NOR + Pilo 244,1 ± 29,2 mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo 202,3 ± 34,8 mg/7 min) também injetada na APM sobre a salivação induzida por pilocarpina ip, porém apresentou uma diferença significativa em relação aos grupos controle ( $p < 0,05$ ) (RX + NOR + Pilo 244,1 ± 29,2 mg/7 min, vs. Salina + Salina + Pilo 488,3 ± 84,5 e Pilo 499,4 ± 40,5 mg/7 min). O grupo que recebeu injeção de Salina + NOR + Pilo na APM obteve uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) em relação a um dos grupos controle (Salina + NOR + Pilo 202,3 ± 34,8 vs. Salina + Salina + Pilo 488,3 ± 84,5) e também ( $p < 0,05$ ) em relação ao outro grupo controle (Salina + NOR + Pilo 202,3 ± 34,8 vs. Pilo 499,4 ± 40,5).

Os animais que receberam tratamento de Salina + Salina + Pilo (n=7) produziram salivação de 470,5 ± 95,1 mg/7 min. Os animais que receberam tratamento somente com Pilo (n=7) produziram salivação de 499,4 ± 40,5 mg/7min. Não ocorreu diferença entre estes grupos. Não houve diferença na salivação basal destes grupos (FIGURA 8).

## SALIVAÇÃO DE RATOS COM IMPLANTE NA APM

\*  $p < 0,05$  quando comparado com salina+salina+pilo e controle pilo

#  $p < 0,001$  quando comparado com salina+salina+pilo



**FIGURA 8:** Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de RX-821002 (RX; 160 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

**7. Efeitos da associação de RX-821002 na dose de 160 nmol/0,5µL e noradrenalina na dose de 160 nmol/0,5µL injetadas na APM na salivação induzida por pilocarpina ip.**

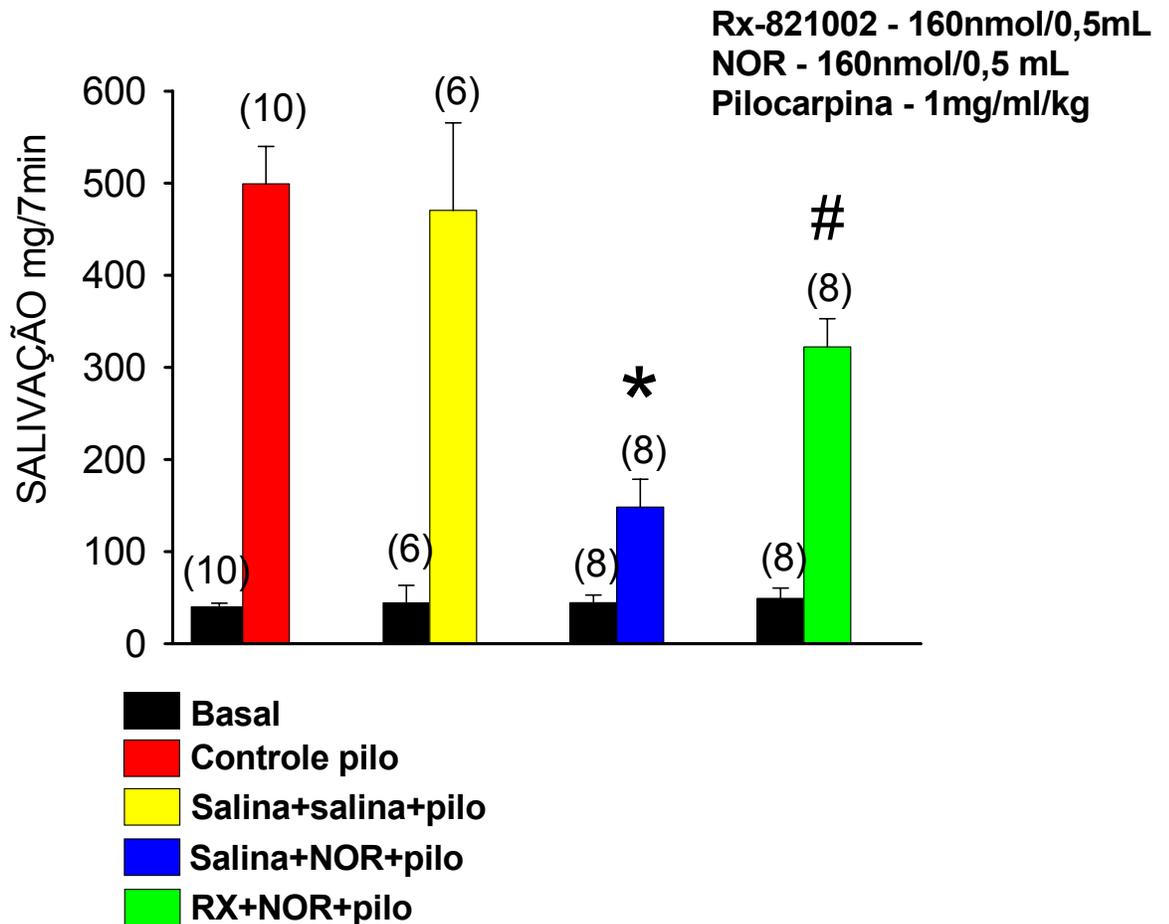
RX-821002 na dose de 160 nmol/0,5 µL injetada na APM (n=8) aboliu a inibição ( $p < 0,05$ ) produzida pela noradrenalina (n=8) na dose de 160 nmol/0,5 µL (RX + NOR + Pilo  $329,9 \pm 77,8$  mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo  $148,2 \pm 30,3$  mg/7 min) também injetada na APM sobre a salivação induzida por pilocarpina ip. O grupo que recebeu injeção de Salina + NOR + Pilo na APM obteve uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) em relação aos grupos controle (Salina + NOR + Pilo  $148,2 \pm 30,3$  vs. Salina + Salina + Pilo  $470,5 \pm 95,1$  e Pilo  $499,4 \pm 40,5$ ).

Os animais que receberam tratamento de Salina + Salina + Pilo (n=6) produziram salivação de  $470,5 \pm 95,1$  mg/7 min. Os animais que receberam tratamento somente com Pilo (n=10) produziram salivação de  $499,4 \pm 40,5$  mg/7min. Não ocorreu diferença entre estes grupos. Não houve diferença na salivação basal destes grupos (FIGURA 9).

## SALIVAÇÃO DE RATOS COM IMPLANTE NA APM

\*  $p < 0,001$  quando comparado com Salina+salina+pilo e Controle pilo

#  $p < 0,05$  quando comparado com Salina+NOR+pilo



**FIGURA 9:** Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de RX-821002 (RX; 160 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

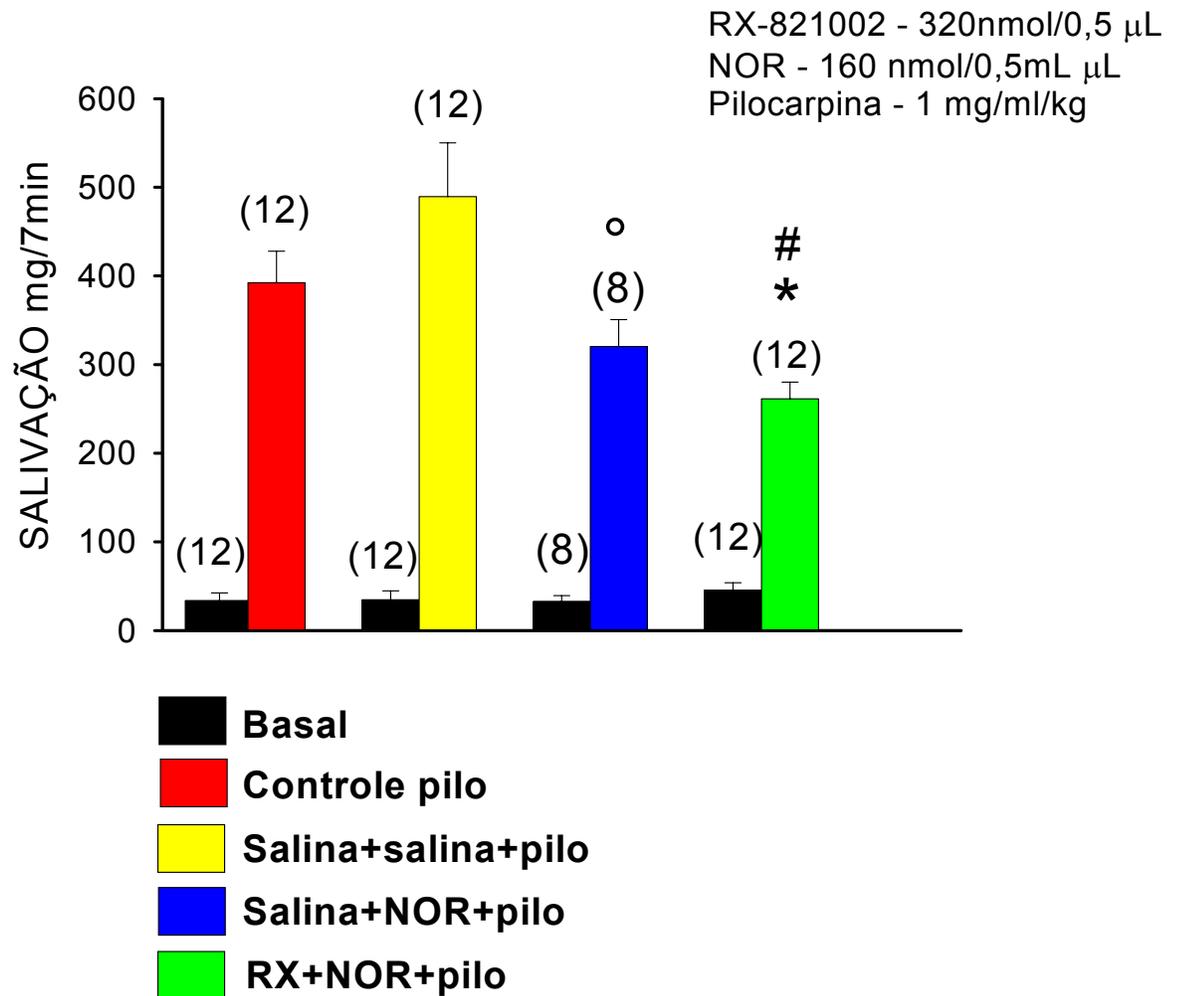
**8. Efeitos da associação de RX-821002 na dose de 320 nmol/0,5µL e noradrenalina na dose de 160 nmol/0,5µL injetadas na APM na salivação induzida por pilocarpina ip.**

RX-821002 na dose de 320 nmol/0,5µL injetada na APM (n=12) não reduziu a inibição produzida pela noradrenalina (n=8) na dose de 160 nmol/0,5 µL (RX + NOR + Pilo 261,3 ± 18,9 mg/7 min, vs. Salina + NOR + Pilo 320,4 ± 30,2 mg/7 min) também injetada na APM sobre a salivação induzida por pilocarpina ip. Este mesmo grupo obteve uma diferença significativa quando comparado com os grupos controle ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) (RX + NOR + Pilo 261,3 ± 18,9 mg/7min vs. Salina + Salina + Pilo 489,6 ± 60,0 mg/7min e RX + NOR + Pilo 320,4 ± 30,2 mg/7min vs. Pilo 392,4 ± 35,5 mg/7min). O grupo que recebeu injeção de Salina + NOR + Pilo na APM obteve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (Salina + NOR + Pilo 320,4 ± 30,2 mg/7min vs. Salina + Salina + Pilo 489,6 ± 60,0 mg/7min).

Os animais que receberam tratamento de Salina + Salina + Pilo (n=12) produziram salivação de 470,5 ± 95,1 mg/7 min. Os animais que receberam tratamento somente com Pilo (n=12) produziram salivação de 499,4 ± 40,5 mg/7min. Não ocorreu diferença entre estes grupos. Não houve diferença na salivação basal destes grupos (FIGURA 10).

## SALIVAÇÃO DE RATOS COM IMPLANTE NA APM

- \*  $p < 0,001$  quando comparado com salina+salina+pilo
- o  $p < 0,05$  quando comparado com salina+salina+pilo
- #  $p < 0,05$  quando comparado com controle pilo



**FIGURA 10:** Secreção salivar (mg/7min) induzida por injeção ip de pilocarpina em ratos previamente tratados com injeção na APM de RX-821002 (RX; 320 nmol) combinado com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou salina combinada com noradrenalina (NOR; 160 nmol) ou apenas salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. Número de animais entre parênteses.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a participação da Área Preóptica Medial (APM) no controle da secreção salivar induzida pela estimulação colinérgica (pilocarpina ip) em ratos.

A primeira parte da pesquisa mostrou que a lesão eletrolítica da APM reduziu a secreção salivar induzida pela injeção de pilocarpina ip.

Os efeitos da lesão foram avaliados 24 horas, 5 dias e 15 dias após a lesão e os resultados mostraram que 24 horas após a lesão da APM, houve uma redução na secreção salivar. A mesma redução também foi observada no grupo de animais experimentados 5 dias após a lesão. Os resultados dos experimentos feitos nos ratos que sofreram a lesão 15 dias antes não mostraram redução na secreção salivar induzida por pilocarpina, porém os resultados nos mostraram uma tendência à recuperação do volume de saliva secretada.

ROSKOWSKA & FONBERG (1972) observaram que lesões bilaterais da AHL, em cães, produziram uma acentuada diminuição nas reações salivatórias incondicionadas, quando comparado com o período pré-lesão. KISSILEF & EPSTEIN (1966) mostraram os efeitos da lesão eletrolítica da AHL, em ratos, sobre a ingestão de água, alimentos e secreção salivar. Esses autores observaram uma redução significativa na secreção salivar basal nos primeiros dias após a lesão. Esses resultados se opõem aos observados por SCHARLET e cols. (1978), que demonstraram que a lesão eletrolítica aguda da AHL produzia um aumento da secreção salivar basal nos primeiros 3 dias após a cirurgia. Passados os 3 dias,

iniciava-se um período de diminuição do fluxo salivar que persistia por todo o período de observação (até o 6º dia).

KISSILEF & EPSTEIN (1969) nos mostram como resultados uma redução significativa da secreção salivar nos primeiros dias após lesão do hipotálamo lateral (HL).

A recuperação da secreção salivar induzida pela injeção de pilocarpina ip 15 dias após a lesão pode também ser observada em ratos com lesão da região AV3V (RENZI e cols. 1990). Foi demonstrada também esta recuperação da função salivar SCHALLERT e cols. (1978) vários dias após a lesão do hipotálamo lateral (HL). No grupo de animais que sofreu a lesão 15 dias antes do experimento não houve diminuição na secreção salivar após a injeção de pilocarpina ip. Nesse período, provavelmente, já estavam instalados mecanismos neurais ou glandulares responsáveis por ajustes que puderam compensar a deficiência ocorrida na salivação dos animais lesados.

Esses dados citados e os atuais, presentes nesse trabalho sugerem a existência de um mecanismo central, no caso a APM, que atua controlando a secreção salivar.

Os resultados da segunda parte do trabalho mostraram que a injeção de noradrenalina na APM inibe a salivação induzida pela pilocarpina ip e que a injeção de antagonistas adrenérgicos nessa mesma área aboliu o efeito do agonista injetado posteriormente.

A inibição da salivação pela ação central da noradrenalina pode envolver pelo menos dois mecanismos eferentes distintos: a) ativação de vias inibitórias do cérebro

para as glândulas salivares; b) inibição de mecanismos inibitórios centrais que são ativados pela pilocarpina para induzir a salivação. Apesar de a ativação de mecanismos inibitórios do cérebro para as glândulas salivares poder facilmente explicar os efeitos produzidos pela noradrenalina central na salivação induzida por pilocarpina ip, não existem evidências da existência de vias inibitórias do cérebro para as glândulas salivares em estudos anteriores (Emmelin, 1987; Garret, 1987). A segunda possibilidade depende da existência de mecanismos excitatórios no sistema nervoso central que são ativados por pilocarpina injetada periféricamente. A evidência para a possível existência desses mecanismos centrais inibitórios da salivação induzida pela pilocarpina ip é o fato de lesões na região prosencefálica (AV3V) (Renzi e cols., 1993) e na APM (presentes resultados) reduzem a salivação induzida por pilocarpina periférica. Similar redução na salivação induzida por pilocarpina ip é produzida pela injeção de noradrenalina central (Moreira e cols., 2002 e presentes resultados) o que sugere que os mesmos mecanismos excitatórios centrais retirados pelas lesões podem ser inibidos pela injeção de noradrenalina na APM.

Estudos anteriores haviam mostrado que a injeção icv de moxonidina (agonista de receptores  $\alpha_2$  e imidazólicos) ou de noradrenalina produzem uma intensa redução da salivação induzida pela pilocarpina (Moreira e cols., 2001, 2002). Os efeitos da moxonidina na salivação poderiam ser devidos a uma modificação na liberação da noradrenalina central pela ativação de receptores adrenérgicos. A noradrenalina atua em receptores adrenérgicos e quando injetada na APM também

produz inibição da salivação, semelhante àquela produzida pela moxonidina. A injeção de antagonistas adrenérgicos  $\alpha_2$  como RX 821002 ou ioimbina bloqueiam completamente os efeitos da noradrenalina e da moxonidina injetadas icv na salivação induzida por pilocarpina (Takakura e cols., 2003; Moreira e cols., 2002).

Os resultados obtidos pela injeção na APM do antagonista adrenérgico  $\alpha_2$  RX-821002, mostraram que a dose de 80 nmol/0,5 $\mu$ L não alterou o efeito anti-salivatório produzido pela injeção de noradrenalina também injetada na APM na salivação induzida por pilocarpina ip. Já este mesmo antagonista, usado na dose de 160 nmol/0,5  $\mu$ L reduziu este efeito anti-salivatório, fazendo com que os valores da secreção salivar chegassem ao dobro daquelas observadas na presença do agonista adrenérgico noradrenalina. O RX-821002 injetado na dose de 320 nmol/0,5  $\mu$ L não reverteu o efeito anti-salivatório da noradrenalina.

Foi utilizado também o antagonista adrenérgico  $\alpha_1$  Prazosin que se mostrou ineficaz no bloqueio da inibição efetuada pelo agonista adrenérgico noradrenalina também injetado na APM.

Os presentes resultados e os já obtidos em nosso laboratório sobre os efeitos de agonistas e antagonistas adrenérgicos injetados centralmente sobre a salivação induzida pela pilocarpina podem trazer subsídios importantes para a compreensão dos mecanismos inibitórios centrais envolvidos no controle da salivação.

Os resultados mostram a lesão da APM reduz a secreção salivar induzida pela injeção intraperitoneal do agonista colinérgico pilocarpina em ratos, sugerindo a participação desta área no controle da secreção salivar e que a noradrenalina injetada

na APM reduz a salivação induzida pela pilocarpina ip e que esse efeito é reduzido pelo bloqueio prévio dos receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  da mesma área, sugerindo a existência de um mecanismo adrenérgico  $\alpha_2$  inibitório da salivação na APM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, M.N.; MALLICK, B.N. Role of lateral preoptic area alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in sleep-wakefulness and body temperature regulation. **Brain Research Bulletin**, 35(2):171-7, 1994.

ANDERSON LC; GARRET JR; ZHANG X; PROCTOR GB; SHORI DK – Differential secretion of proteins by rat submandibular acini and granular ducts on graded autonomic nerve stimulations. **Journal of Physiology**, 485: 503-511, 1995.

ANDERSON LC & GARRET JR – Neural regulation of blood flow in the rat submandibular gland. **European Journal of Morphology**, 36: 213-218, 1998.

BAUM, B.J. Neurotransmitter control of secretion. **Journal of Dental Research**, 66: 628-632, 1987.

BERNARD, C – De l'influence de deux orders de nerfs qui déterminent les variations de couleur du sang vaiseaux dans les organes glandulaires. **C. R. Acad Sci.**, 47: 245-253, 1858.

BRADLEY, R.M. Salivary secretion. In SMELL AND TASTE IN HEALTH AND DISEASE. Edited by Getchell et al. Published by Raven Press. New York, p. 127-147, 1991.

BRODY, M.J.; FINK, G.D.; BUGHEY, J.; HAYWOOD, J.R.; GORDON, F.J. e JOHNSON, A.K. The role of the anteroventral third ventricle (AV3V) region in experimental hypertension. **Circ. Res.**, 43: 1-13, 1978.

BROWN, J.C. & HOWLETT, B. - The nucleus supragenualis, presumptive superior salivatory nucleus. **Acta Anatomy**, 76: 35-46, 1970.

CECANHO, R.; ANAYA, M.; RENZI, A.; MENANI, J.V. e DE LUCA JR., L.A. Sympathetic mediation of salivation induced by intracerebroventricular pilocarpine in rats. **Journal of Autonomic Nervous System**, 76: 9-14, 1999.

CONTRERAS, R.J.; GONEZ, M.M. & NORGREN, R. - Central origins of cranial nerve parasympathetic neurons in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 190: 373-394, 1980.

DELFS, U. & EMMELIN, N. Parasympathetic degeneration secretion of saliva in rats. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, 64: 109-117, 1979.

EMSBERGER, P.; ELLIOT, HL.; WEIMAN, HJ. Moxonidine: a second-generation central antihypertensive agent. **Cardiovascular Drugs Therapy**, 11:411-431, 1993.

EMSBERGER, P.; HAXHIU, MA.; GRAFF, LM. A novel mechanism of action for hypertension control: moxonidine as a selective I<sub>1</sub>-imidazoline agonist. **Cardiovascular Drugs Therapy**, 8: 27-41, 1994.

EDWARDS, AV; TOBIN G; EKSTROM J; BLOOM SR. – Nitric oxide and release of the peptide VIP from parasympathetic terminals in the submandibular gland of the anaesthetized cat. **Experimental Physiology**, 81: 349-359, 1996.

EISENMAN, J.S. & AZMITIA, E.C. - Physiological stimulation enhances HRP marking of salivatory neurons in rats. **Brain Research Bulletin**, 8: 73-78, 1982.

ELVERDIN, J.C.; LUCHELLI-FORTIS, M.A.; STEFANO, F.J.E. e PEREC, C.J. Alpha-1 adrenoceptors mediate secretory responses to norepinephrine in innervated and denervated rat submaxillary glands. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 229: 261-266, 1984.

EMMELIN, N. e MUREN, A. Acetylcholine release at parasympathetic synapses. **Acta Physiologica Scandinavica**, 20: 13-32, 1950.

EMMELIN, N. Nerve interactions in salivary glands. **Journal of Dental Research**, 66: 509-517, 1987.

FLYNN, F.W.; EVEY, L.A. e MITCHELL, J.C. Heat-induced saliva secretion and thermoregulation in female rats with ventromedial hypothalamic lesions. **Physiology and Behavior**. 26: 779-782, 1981.

FREITAS, M.J.M.; RENZI, A. e DE LUCA JR, L.A. Remoção das glândulas salivares e ingestão de NaCl em ratos. In: RESUMOS DA IX REUNIÃO ANUAL DA FESBE, p. 7, 1994.

GARRET JR. The innervation of salivary gland. **Journal of Royal Microscopical Society**, 85: 135-148, 1966.

GARRET JR. The proper role of nerves in salivary secretion: A review. **Journal of Dental Research**, 66: 387-397, 1987.

GARRET, JR.; SULEIMAN, A.M.; ANDERSON, L.C. e PROCTOR, G.B. Secretary responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic nerve stimulation in rats. **Cell Tissue Research**, 264: 117-126, 1991.

GARRET JR e ANDERSON, L.C. Rat sublingual salivary glands: secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. **Archives of Oral Biology**, 36: 675-683, 1991.

HANDA, R.J.; RESKO, J.A. Alpha-adrenergic regulation of androgen receptor concentration in the preoptic area of the rat. **Brain Research**, 483(2): 312-20, 1989.

HEIDENHAIN R – Uber dir Wirkung einiger Gifte auf die Nerven der Glandula submaxilaris. **Pflugers Archives**, 5: 309-318, 1872.

HELLEKANT, G. e HAGSTROM, E.C. Eferent chorda tympani activity and salivary secretion in the cat. **Acta Physiologica Scandinavica**, 90: 533-543, 1974.

HIRAMATSU, Y.; ECKELMAN, W.C.; CARRASQUILLO, J.A.; MILETICH, R.S.; VALDEZ, I.H.; KURRASCH, R.H.M.; MACYNSKI, A.A.; PAIK, C.H.;

NEUMANN, R.D. e BAUM, B.J. Kinetic analysis of muscarínico receptors in human brain and salivary gland in vivo. **American Journal of Physiology**, 268: R1491-R1499, 1995.

HOSOYA, Y.; MATSUSHITA, M. & SUGIURA, Y. - A direct hypothalamic projection to the superior salivatory nucleus neurons in the rat. A study using anterograde autoradiographic and retrograde HRP methods. **Brain Research**, 266: 329-333, 1983.

HOSS, W.; WOODRUFF, J.M.; ELLERBROCK, B.R.; PERIYASAMY, S.; GHODSI-HOVSEPIAN, S.; STIBBE, J.; BOHNETT, M. e MESSER JR, W.S. Biochemical and behavior responses of pilocarpine at the muscarínico receptor subtypes in the CNS. Comparison with receptor binding and low-energy conformations. **Brain Research Bulletin**, 553: 232-238, 1990.

HÜBSCHLE, T.; MCKINLEY, M.J.; OLDFIELD, B.J. Efferent connection of lamina terminalis, the preoptic area and the insular cortex to submandibular and sublingual gland of the rat traced with pseudorabies virus. **Brain Research**, 806: 219-231, 1998.

IZUMI, H. e KARITA, K. Parasympathetic-mediated reflex salivation and vasodilatation in the cat submandibular gland. **American Journal of Physiology**, 267: R747-753, 1994.

IZUMI, H.; NAKAMURA, I. e KARITA, K. Effects of clonidine and yohimbine on parasympathetic reflex salivation and vasodilatation in cat SMG. **American Journal of Physiology**, 268: R1196-R1202, 1995.

JANSEN, A.S.P.; TER HORST, G.J.; METTENLEITER e LOEWY A.D. CNS cell groups projecting to the submandibular parasympathetic preganglionic neurons in the rat: a retrograde transneuronal viral cell body labeling study. **Brain Research**, 572: 253-260, 1992.

JENSEN, J.L.; BRODIN, P.; BERG, T. e AARS H. Parotid secretion of fluid amylase and kallikrein during reflex stimulation under normal conditions and after acute administration of autonomic blocking agents in man. **Acta Physiologica Scandinavica**, 143: 321-329, 1991.

KANOSUE, K.; NAKAYAMA, T.; TANAKA, H.; YANASE, M. e YASUDA, H. Modes of action of local hypothalamic and skin thermal stimulation on salivary secretion in rats. **Journal of Physiology**, 424: 459-471, 1990.

KRUGER, L.; SAPORTA, S. & SWANSON, L.W. - Photographic atlas of the brain.

**Cambridge University Press**, New York, N.Y., 1<sup>a</sup> ed., 1995.

LOEWY, A.D. Anatomy of the autonomic nervous system: an overview. In Central

Regulation of Autonomic Functions. Edited by Loewy, A.D. and Spyer, K.M.

Published by Oxford University Press. Oxford, p. 1-16, 1990.

MANDEL, I.D.; KATZ, R.L.; ZENGO, A.; KUTSCHER, A.H.; GREENBERG,

R.A.; KATZ, S.; SCHARF, R. e PINTOFF, A. The effect of pharmacologic agents on salivary secretion and composition in man I. pilocarpine, atropine and

anticholinesterases. **Journal of Oral Therapeutics and Pharmacology**, 4: 192-199, 1968.

MARTINEZ, J.R. e CASSITY, N. Salivary secretion induced from isolated, perfused

rat submandibular glands by sympathomimetic agents. **Archives of Oral Biology**,

28: 1101-1108, 1983.

MATSUO, R. e YAMAMOTO, T. Gustatory-salivary reflex: neural activity of

sympathetic and parasympathetic fibers innervating of submandibular gland of the

hamster. **Journal of the Autonomic Nervous System**, 26: 187-197, 1989.

- MOREIRA, TS; COLOMBARI, E; DE LUCA JR., LA; RENZI, A. MENANI, JV. –  
Salivatory and cardiovascular responses in rats treated with moxonidine and  
pilocarpine. *Abstract- 30<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience*, New  
Orleans, LA, USA, November 4-9, part 2, p.1951, 2000.
- MOREIRA, TS; TAKAKURA, ACT; DE LUCA JR., LA; RENZI, A. MENANI, JV.  
– Inhibition of pilocarpine-induced salivation in rats by central noradrenaline.  
**Archives of Oral Biology**, 47: 429-434, 2002.
- MORENO, M.; MAQUEDA, I.; NARANJO, J.A. e MARTINEZ de VICTORIA, E.  
Influence of superior cervical ganglion stimulation frequency on salivary  
secretion in the rabbit. Comparative study of parotid and mandibular glands.  
**Revista Espanhola de Fisiologia**, 42: 489-496, 1986.
- NICHOLSON, J.E. e SEVERIN, C.M. The superior and inferior salivatory nuclei in  
the rat. **Neuroscience Letters**, 21: 149-154, 1981.
- NORBERG, K.A. e OLSON, L. Adrenergic innervation of the salivary glands in the  
rat. **Zeitschrift fur Zellforschung**, 68: 183-189, 1985.
- OHLIN, R. e PEREC, C. Salivary secretion of the major sublingual glands of the rats.  
**Esperientia**, 21: 408, 1965.

PARKINSON, D. Cholinergic receptors. In: **Central Regulation of Autonomic Functions**. Edited by Loewy A.D. and Spyer, K.M. Published by Oxford University Press. Oxford, 28-43, 1990.

PAXINOS, G. & WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, San Diego, California, 2<sup>a</sup> ed., 1986.

RAMESH, V.; KUMAR, V.M. The role of alpha-2 receptors in the medial preoptic area in the regulation of sleep-wakefulness and body temperature. **Neuroscience**, 85(3): 807-17, 1998.

RAMOS, J.M.J.; CASTILHO, M.E. e PUERTO, A. Salivatory neurons in the brainstem nucleus parvocellularis of the rat: Effects of electrolytic lesions. **Brain Research Bulletin**, 21: 547-555, 1988, a.

RAMOS, J.M.J.; CASTILHO, M.E. e PUERTO, A. Submandibular and parotid salivary secretion after electrolytic lesioning of brainstem nucleus parvocellularis in the rat. **Physiological and Behavior**, 44: 173-180, 1988, b.

RAMOS, J.M.J.; CASTILHO, M.E. e PUERTO, A. Peripheral pathways mediating salivary secretion after nucleus parvocellularis activation in the rat. **Brain Research Bulletin**, 22: 469-473, 1989.

RENZI, A.; LOPES, R.L.; SALA, M.A.; CAMARGO, L.A.A. MENANI, J.V.; SAAD, W.A. e CAMPOS, G.M. Morphological, morphometric and stereological study of submandibular gland in rats with lesion of the anteroventral region of the third ventricle (AV3V). **Experimental Pathology**, 38: 117-187, 1990.

RENZI, A.; COLOMBARI, E.; MATTOS FILHO, T.R.; SILVEIRA, J.E.N.; SAAD, W.A.; CAMARGO, L.A.A.; DE LUCA JR., L.A.; DERÓBIO J.G. e MENANI, J.V. Involvement of the central nervous system in the salivary secretion induced by pilocarpine in rats. **Journal of Dental Research**, 72: 1481-1484, 1993.

RENZI, A. Papel do Sistema Nervoso Central no controle da secreção salivar induzida pela injeção periférica ou central de pilocarpina em ratos. **Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara-UNESP**. Tese de Livre Docência, 1994.

SARACCO, C.G. e CRABILL, E.V. Anatomy of the human salivary glands. In: **Biology of the Salivary Glands**. Edited by Dobrosielsky K.-Vergona. Published by CRC Press. New York, 1993.

SHUTE, C.C.D. & LEWIS, P.R. - The salivatory centre in the rat. **Journal of Anatomy**, 94: 59-73, 1960.

TAKEUCHI, Y.; FUKUI, Y.; ICHIYAMA, M.; MIYOSHY, S. e NISHIMURA, Y.  
Direct amygdaloid projections to the superior salivatory nucleus: a light and electron microscopic study in the cat. **Brain Research Bulletin**, 27: 85-92, 1991.

TEMPLETON, D. e THULIN, A. Secretory, motor and vascular effects in the sublingual gland of the rat caused by autonomic nerve stimulation. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, 63: 59-66, 1978.

THULIN, A. Motor and secretory effects of autonomic nerves and drugs in the rat submaxillary gland. **Acta Physiologica Scandinavica**, 92: 217-223, 1974.

THULIN, A. Motor and secretory effects of nerves on the parotid gland of the rat. **Acta Physiologica Scandinavica**, 96: 506-511, 1976 a.

THULIN, A. Blood flow changes in the submaxillary gland of the rat on parasympathetic and sympathetic nerves stimulation. **Acta Physiologica Scandinavica**, 97: 104-109, 1976 b.

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