FERNANDA DE PAULA DOS SANTOS

Morfogênese das glândulas salivares humanas: Estudo topográfico das aquaporinas 1, 3 e 5 e sua relação com as células mioepiteliais, rede vascular e inervação no desenvolvimento glandular

São Paulo

2020

FERNANDA DE PAULA DOS SANTOS

Morfogênese das glândulas salivares humanas: Estudo topográfico das aquaporinas 1, 3 e 5 e sua relação com as células mioepiteliais, rede vascular e inervação no desenvolvimento glandular

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia, para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Santos, Fernanda de Paula dos.
Morfogênese das glândulas salivares humanas: Estudo topográfico das aquaporinas 1, 3 e 5 e sua relação com as células mioepiteliais, rede vascular e inervação no desenvolvimento glandular / Fernanda de Paula dos Santos; orientador Marcello Menta Simonsen Nico. -- São Paulo, 2020.
181 p. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Radiologia e Imaginologia Odontológica. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida.

1. Glândulas salivares. 2. Aquaporinas. 3. Células mioepiteliais. 4. Suprimento sanguíneo. 5. Inervação. I. Nico, Marcello Menta Simonsen. II. Título.

Santos FP. Morfogênese das glândulas salivares humanas: Estudo topográfico das aquaporinas 1, 3 e 5 e sua relação com as células mioepiteliais, rede vascular e inervação no desenvolvimento glandular. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em:13/07/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr.Victor Elias Arana Chavez

Instituição: FO - USP Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Flavio Carneiro Hojaij

Instituição: UNIFESP (FO) Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Fabiana Martins de Paula

Instituição: HCFMUSP (FM) Julgamento: Aprovada

A Deus,

Às minhas mães Maria,

À minha família, de sangue e de coração.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço, pela sua dedicação, apoio e disponibilidade durante o desenvolvimento desta tese, pelo imenso incentivo para realização do Doutorado Sanduíche e em tantos outros momentos. Sou muito grata por tudo e por tanto.

Ao Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico, pela oportunidade de desenvolver este projeto de doutorado e frequentar o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) participando dos Ambulatórios de Estomatologia. O convívio com os pacientes me proporcionou valiosa evolução profissional e pessoal.

À Profa. Dra. Abigail Saffron Tucker pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche em seu laboratório, por seu estímulo e ensinamentos.

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), Instituto de Medicina Tropical (IMT), à Faculdade de Medicina da USP e Departamento de Desenvolvimento Craniofacial e de Biologia das Células-Tronco do King's College London (Reino Unido) por disponibilizar toda a estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também aos professores e funcionários dessas instituições pelo suporte e amizade.

Às minhas amigas de vida e de laboratório Milena Monteiro Antunes e Tathyane Nakajima Teshima, por todo o apoio profissional e emocional. Estendo esse agradecimento com um abraço ao Bento.

Aos meus amigos da pós graduação (por ordem alfabética), Ana Maria Gonçalves da Silva, Ana Maria Hoyos Cadavid, Claudia Arruda, Elisa Costa Marques, Francisca de Fatima Valentin, Fabio Andriolo, Giovanna Florezi, Jaqueline Vanini, Juliana Goldbaum Crescente, Maria Aparecida Pinto (Cidinha), Raquel Silva, Ricardo Hsieh, Rupali Lav, Sheila Bologna, Veronica Otoni, Wanessa Siqueira e a cada um que contribuiu de alguma forma com esse trabalho. Juntos dividimos

momentos de alegrias e apreensões, sempre com responsabilidade e o bom humor que fizeram esta caminhada mais leve.

Ao Prof. Dr. Antônio Sesso, pela primeira oportunidade de atuar em um laboratório de pesquisa e por compartilhar de seu microscópio de fluorescência, utilizado nesta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa. Além disso, parte do presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), que proporcionou o financiamento durante período de Doutorado Sanduíche no Exterior, Processo nº 88881.188920/2018-01.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus, quando considero quantas maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileu Galilei

RESUMO

Santos FP. Morfogênese das glândulas salivares humanas: Estudo topográfico das aquaporinas 1, 3 e 5 e sua relação com as células mioepiteliais, rede vascular e inervação no desenvolvimento glandular [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

As glândulas salivares têm sido alvo de diversos estudos acerca de sua fisiologia, funções e distúrbios associados à síntese e secreção de saliva. Diante disso, compreender melhor o desenvolvimento glandular pode auxiliar a estabelecer modelos de terapias regenerativas. Durante o período de morfogênese, as glândulas salivares desenvolvem-se de maneira complexa, influenciadas por diversos estímulos e sinalização mesenquimais, onde a microcirculação e a inervação atuam desde os estágios mais incipientes do desenvolvimento, contribuindo com a maturação estrutural e funcional do epitélio glandular. Para que a salivação ocorra, se faz necessária uma série de eventos envolvendo uma rede de interação entre membros de uma família de proteínas de canais de membrana denominada aquaporinas (AQPs), células mioepiteliais, vasculatura local e inervação autônoma. Com a hipótese de que as aquaporinas são fundamentais para a coordenação da maturação funcional glandular durante o desenvolvimento, pretendemos responder as seguintes perguntas: qual a correlação das AQPs 1, 3 e 5 com o desenvolvimento primitivo das células mioepiteliais, vascularização e inervação? Para responder essa questão, utilizamos a estratégia de análise da imunoexpressão histoquímica e fluorescente das proteínas AQP1, AQP3, AQP5 em dupla marcação com as proteínas AML, CD34, S100 e Tuj-1 nas glândulas salivares parótidas e submandibulares e de glândulas salivares menores humanas em seus diversos estágios de morfogênese. Foram analisadas qualitativamente as possíveis diferenças no padrão de expressão dos marcadores citados de acordo com os distintos estágios de maturação e tipos glandulares. Todas as proteínas foram expressas nos espécimes analisados, com diferenças de expressão nos distintos períodos do desenvolvimento glandular. Houve colocalização entre AQP1 e CD34 em diversos sítios vasculares, além de coexpressão entre AQP1, AML e S100 tanto na microvasculatura quanto em células mioepiteliais. A maturação morfológica das

glândulas salivares menores é precoce e é observada anteriormente a das glândulas parótidas e submandibulares, embora as parótidas sejam as primeiras glândulas salivares identificadas no embrião humano. Os resultados obtidos sugerem que os distintos tipos glandulares se desenvolvem em diferentes períodos devido às características anatômicas finais mais ou menos robustas assumidas individualmente e, ainda, além das aquaporinas, estruturas mioepiteliais, vasculares e nervosas se integram de maneira constitutiva às estruturas epiteliais e estromais, formando um arranjo essencial requerido à evolução da arquitetura das glândulas salivares, comprovada pelo aumento exponencial da maioria das proteínas estudadas, conforme o avanço do desenvolvimento.

Palavras-chave: Desenvolvimento. Glândulas salivares. Aquaporinas. Células mioepiteliais. Suprimento sanguíneo. Inervação.

ABSTRACT

Santos FP. Human salivary glands morphogenesis: topographic study of aquaporins 1, 3 and 5 and their correlation with myoepithelial cells, vascular network and innervation during glandular development [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Corrigida.

Salivary glands have been the subject of several studies about their physiology, functions and disorders associated with the synthesis and secretion of saliva. Therefore, a better understanding of glandular development can auxiliate to establish models of regenerative therapies. During morphogenesis period, the salivary glands develop in a complex way influenced by many mesenchymal stimuli and signaling, which microcirculation and innervation act since the most incipient stages of development, contributing to the structural and functional maturation of the glandular epithelium. To the salivation to occur, a series of events involving a network of interaction between members water channel proteins family called aquaporins (AQPs), myoepithelial cells, local vasculature and autonomic innervation are necessary. With the hypothesis that aquaporins are fundamental to the coordination of glandular functional maturation during development, we intend to answer the following questions: what is the correlation of AQPs 1, 3 and 5 with the primitive development of myoepithelial cells, vascularization and innervation? To answer this question, we used the histochemical and fluorescent immunoexpression analysis strategy of the AQP1, AQP3, AQP5 proteins, double labeling with the SMA, CD34, S100 and Tuj-1 proteins in the major parotid and submandibular salivary glands, in addition to minor salivary glands human. The possible differences in the expression pattern of the cited markers were qualitatively analyzed according to the different maturation stages and glandular types. All the proteins were expressed in the analyzed specimens, with differences in expression at different periods of glandular development. There was colocalization between AQP1 and CD34 in several vascular sites, in addition to coexpression between AQP1, SMA and S100 both in the microvasculature and in myoepithelial cells. The morphological maturation of the minor salivary glands is precocious and is observed before those of the parotid and submandibular glands, although parotids are the first salivary

glands identified in the human embryo. The results obtained suggest that the different glandular types develop in different periods due to the more or less robust final anatomical characteristics assumed individually and, in addition to the aquaporins, myoepithelial, vascular and nervous structures are constitutively integrated into the epithelial and stromal structures, forming an essential arrangement required to the salivary gland architecture evolution, evidenced by the exponential increase of the most studied proteins, as the development progresses.

Keywords: Development. Salivary Glands. Aquaporins. Myoepithelial cells. Blood supply. Innervation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento das glândulas salivares e suas respectivas imagens histológicas 34

Figura 2.2 – Representação esquemática das glândulas salivares maiores 36

Figura 2.3 - Figura esquemática da glândula salivar totalmente desenvolvida ilustrando células parenquimatosas em detalhes. 39

Figura 2.4 - Esquema ilustrando o mecanismo de fornecimento de água e diversos substratos realizados pela rede microvascular e sua comunicação com ácinos e ductos da glândula salivar. 42

Figura 2.5 - Figura ilustrando a rede entrelaçada de vasos sanguíneos (vermelho) e nervos (verde) no epitélio glandular submandibular (azul) de camundongo durante o período de embriogênese (E13) 42

Figura 2.6 - Esquema ilustrando a localização celular das proteínas de canais de água aquaporinas atuantes no parênquima de glândulas salivares. 47

Figura 2.7 - Esquema ilustrando o processo de formação salivar 58

Figura 4.1 - Figura ilustrando o processo de dissecção das GSMs e GSLs de embriões de camundongos CD1..... 70

Figura 5.1 - Exemplos dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e CD34 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP)..... 76

Figura 5.2 - Exemplos dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e CD34 em GP. 77

Figura 5.3 - Exemplos dos resultados dos ensaios de colocalização AQPs 1, 3 e 5 e CD34 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM). 79

Figura 5.4 - Exemplos dos resultados dos ensaios de colocalização por imunofluorescência das AQPs 3 e 5 e CD34 em GSM..... 80

Figura 5.5 - Exemplos dos resultados de colocalização entre AQPs 1, 3 e 5 e CD34 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas salivares menores (GM). 82

Figura 5.6 - Exemplos dos ensaios de imunofluorescência evidenciando dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e CD34 em GM. 83

Figura 5.7 - Exemplos dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e AML nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP). 85

Figura 5.8 - Exemplos dos ensaios de imunofluorescência evidenciando dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e AML em GP.....87

Figura 5.9 - Exemplos dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e AML nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM).....89

Figura 5.10 - Exemplo dos ensaios de imunofluorescência de dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e AML em GSM.....90

Figura 5.11 - Exemplos dos resultados dos ensaios de colocalização das proteínas AQPs 1, 3 e 5 e AML nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas menores (GM). 92

Figura 5.12 - Exemplos dos resultados de imunofluorescência para colocalização das proteínas AQPs 1, 3 e 5 e AML em glândulas salivares menores. 94

Figura 5.13 - Exemplos dos ensaios da colocalização das proteínas AQPs 1, 3 e 5 e S100 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP). 96

Figura 5.14 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e S100 em glândulas parótidas..97

Figura 5.15 - Exemplos dos resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e S100 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM). 99

Figura 5.16 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e S100 em glândulas submandibulares. 100

Figura 5.17 - Exemplos dos resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e S100 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas menores (GM). 102

Figura 5.18 - Exemplos dos resultados de imunofluoresciencia com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e S100 em glândulas salivares menores. 103

Figura 5.19 - Exemplos de resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e Tuj-1 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP). 105

Figura 5.20 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e Tuj-1 em glândulas parótidas 106

Figura 5.21 - Exemplos de resultados de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre S100 e Tuj-1 em glândulas parótidas na 24ª semana de desenvolvimento. 108

Figura 5.22 - Exemplos dos resultados de ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e Tuj-1 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM). 110

Figura 5.23 - Exemplos dos resultados de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e Tuj-1 em glândulas submandibulares. 111

Figura 5.24 - Exemplos dos resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e Tuj-1 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas menores (GM). 113

Figura 5.25 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e Tuj-1 em glândulas salivares menores. 114

Figura 5.26 - Descrição dos estágios da morfogênese da GSM de embriões de camundongos. 118

Figura 5.27 - Padrão de expressão de AQP1 durante o desenvolvimento da glândula submandibular de camundongo CD1 119

Figura 5.28 - Padrão de expressão das AQPs 1, 3 e 5 em dupla marcação com PH3 em espécimes de GSM e GSL de embriões de camundongos CD1 122

Figura 5.29 – Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQP1 e AML e AQP1 e CD31 em espécimes de GSM e GSL de embriões de camundongos CD1 124

Figura 6.1 - Expressão de AML (verde) e CD34 (vermelho) em glândula salivar menor, espécime de língua, 12 semanas, aumento 40x. 137

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AML	Actina de Músculo Liso
AQPs	Aquaporinas
AQP1	Aquaporina 1
AQP3	Aquaporina 3
AQP5	Aquaporina 5
AQP5	Aquaporina 5
ARRIVE	*Animal Research: Reporting of in vivo Experiments*
BSA	*Bovine Serum Albumin*
BSU	Unidade de Serviços Biológicos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD31	*Cluster of Differentiation*-31
CD34	*Cluster of Differentiation*-34
CGRP	*Calcitonin gene-related peptide*
CME	Célula Mioepitelial
DAB	Diaminobenzidina
FGF2	*Fibroblast Growth Factor*
GM	Glândular salivar Menor
GSL	Glândula Sublingual
GSM	Glândula Submandibular
GP	Glândula Parótida
IHC-IF	Imunofluorescência
IHC-P	Imunoistoquímica parafinada
min	minuto
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NPY	neuropeptídeo Y
PBS	*Phosphate-bufferid saline*
PBSTr	Phosphate-bufferid saline Triton
PDSE	Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior
pH	poder Hidogeniônico

PH3	*Phospho-Histone H3*
SMA	*Smooth Muscle Actin*
TA	Temperatura ambiente
TRIS	hidroximetil aminometano
VIP	*Vasoactive Intestinal Peptide*

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
ºC	graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 27

2 REVISÃO DA LITERATURA 31

2.1 GLÂNDULAS SALIVARES 31

2.1.1 O desenvolvimento das glândulas salivares 31

2.1.2 Glândulas salivares maiores e menores 35

2.1.3 Histologia das glândulas salivares maiores e menores 37

2.2 VASCULARIZAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES 40

2.3 INERVAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES 43

2.4 AQUAPORINAS 45

2.4.1 Aquaporina 1 (AQP1) 47

2.4.2 Aquaporina 3 (AQP3) 48

2.4.3 Aquaporina 5 (AQP5) 49

2.5 PROTEÍNAS VASCULARES, MIOEPITELIAIS E NERVOSAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES 52

2.5.1 Cluster of Differentiation-34 (CD34) 52

2.5.2 Actina de Músculo liso (AML) 53

2.5.3 S100 54

2.5.4 Tuj-1 56

2.6 SALIVA 57

3 PROPOSIÇÃO 61

3.1 OBJETIVOS GERAIS 61

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 61

4 MATERIAIS E MÉTODOS 63

4.1 DUPLA MARCAÇÃO EM IMUNOISTOQUÍMICA (IHC-P) 64

4.1.1 Análise de resultados obtidos por meio de imunoistoquímica (IHC-P) 66

4.2 DUPLA MARCAÇÃO EM IMUNOFLUORESCÊNCIA (IHC-IF) 66

4.2.1 Análise de resultados obtidos por meio de imunofluorescência (IHC-IF) 68

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS PROGRAMA DOUTORADO SANDUÍCHE NO EXTERIOR (PDSE) 69

4.3.1 Obtenção dos espécimes 69

4.3.2 Cultura de Tecido 70

4.3.3 Processamento dos espécimes - Imunofluorescência em *whole mount* ... 70

5 RESULTADOS 73

5.1 ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES HUMANAS EM DESENVOLVIMENTO - PANORAMA GERAL 73

5.2 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE REDE VASCULAR E AQPS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES 74

5.2.1 Colocalização de proteínas vasculares (CD34) e AQPs 1, 3 e 5 na glândula parótida (IHC-P e IHC-IF) 74

5.2.2 Colocalização de proteínas vasculares (CD34) e AQPs 1, 3 e 5 na glândula submandibular (IHC-P e IHC-IF) 78

5.2.3 Colocalização de proteínas vasculares (CD34) e AQPs 1, 3 e 5 nas glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF) 81

5.3 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE CÉLULAS MIOEPITELIAIS E AQPS EM GLANDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES 84

5.3.1 Ensaios de colocalização das proteínas AML e AQPs 1, 3 e 5 na glândula parótida (IHC-P e IHC-IF) 84

5.3.2 Ensaios de colocalização das proteínas AML e AQPs 1, 3 e 5 na glândula submandibular (IHC-P e IHC-IF) 88

5.3.3 Ensaios de colocalização das proteínas AML e AQPs 1, 3 e 5 nas glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF) 91

5.4 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE INERVAÇÃO/ CÉLULAS MIOEPITELIAIS E AQPS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES 95

5.4.1 Ensaios de colocalização das proteínas S100 e AQPs 1, 3 e 5 em GP (IHC-P e IHC-IF) 95

5.4.2 Ensaios de colocalização das proteínas S100 e AQPs 1, 3 e 5 na glândula submandibular (IHC-P e IHC-IF) 98

5.4.3 Ensaios de colocalização das proteínas S100 e AQPs 1, 3 e 5 nas glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF) 101

5.5 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE INERVAÇÃO AUTÔNOMA E AQPS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES 104

5.5.1 Ensaios de colocalização das proteínas Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 na glândula parótida (IHC-P e IHC-IF) 104

5.5.2 Ensaios de colocalização das proteínas Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 em glândulas submandibulares (IHC-P e IHC-IF) 109

5.5.3 Ensaios de colocalização das proteínas Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 em glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF) 112

5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA EXPRESSÃO DAS AQPS 1, 3 E 5 DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE GLÂNDULAS SALIVARES DE CAMUNDONGO.. 116

5.6.1 Análise morfológica da expressão de AQP1 em GSM e GSL de embriões de camundongos..... 119

5.6.2 Análise morfológica da expressão das AQPs 1, 3 e 5 em GSM e GSL de embriões de camundongos..... 120

6 DISCUSSÃO..... 127

7 CONCLUSÕES..... 145

REFERÊNCIAS..... 149

ANEXOS..... 171

1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de desenvolvimento, a morfogênese de botões epiteliais ocorre de modo semelhante em diversos órgãos como glândulas salivares, rins, pulmões e glândulas mamárias (Sekiguchi et al., 2020). A morfogênese das glândulas salivares passa por fases complexas e dinâmicas, envolvendo uma série de processos celulares. Esses eventos coordenados contribuem para a formação da arquitetura tecidual, resultando em uma rede de ductos e ácinos secretores, cuja principal função é produzir e secretar saliva (Patel et al., 2006; Lourenço et al., 2007, 2008; Hsu; Yamada, 2010; Teshima et al., 2016).

Essencial para a manutenção da homeostase oral, a saliva é um fluido composto principalmente por água e atua na proteção da mucosa e superfícies dentárias contra injúrias e infecções, possui característica hidratante e é fundamental para funções fisiológicas como fala, mastigação e deglutição, contribuindo diretamente para uma boa qualidade de vida. Por ser um fluido aquoso, o transporte celular de água entre membranas do epitélio glandular torna-se indispensável, e é facilitado por alguns membros de uma família de proteínas transmembrânicas conhecidas como aquaporinas (AQPs) (Delporte; Steinfeld, 2006; Dodds et al., 2005; Delporte et al., 2016; Milanowski et al., 2017; Li; Wang, 2017).

As aquaporinas são uma família de proteínas capazes de formar poros seletivos na bicamada fosfolipídica da membrana plasmática favorecendo o fluxo transcelular de água (Day et al., 2014; Delporte et al., 2016; Li; Wang, 2017). Muito recentemente, foi identificada uma nova integrante da família das AQPs, somando 14 proteínas que podem atuar em diferentes órgãos e tecidos (Chauvigné et al., 2019). Embora alguns membros deste grupo de proteínas atuem de forma efetiva na fisiologia das glândulas salivares, a AQP5 exerce papel central no processo de secreção (Delporte; Steinfeld, 2006).

Após a formação de saliva, a contração mecânica do parênquima glandular é realizada com auxílio das células mioepiteliais (CMEs), facilitando a expulsão do fluido para a cavidade oral (Kwak et al., 2016). O conhecimento biofuncional dessas

estruturas ainda é limitado, no entanto, sabe-se que as CMEs são compostas por uma gama de proteínas contráteis como actina, miosina e calponina (Chitturi et al., 2015) e que seu estímulo ocorre via sistema nervoso autônomo (Ogawa, 2003). Ainda, a comunicação entre células do parênquima, mesênquima, inervação e vascularização das glândulas salivares influencia o desenvolvimento e estabelecimento de glândulas salivares funcionais (Mattingly et al., 2015).

O papel da inervação e da vasculatura durante o desenvolvimento glandular ainda não está totalmente elucidado, mas sabe-se que durante a morfogênese de ramificação glandular, processo pelo qual o parênquima atinge maturidade estrutural, a angiogênese e ramificação da rede vascular se desenvolvem de forma análoga ao epitélio, não se sabe, porém, se a sinalização vascular é capaz de guiar a formação glandular (Kwon et al., 2017). Foi observado, no entanto, que a inibição da vascularização em embriões de camundongos pode causar a formação de estruturas glandulares dismórficas (Kwon et al., 2017) e que endotelinas servem como guia para neurônios simpáticos durante a formação da rede nervosa no órgão (Makita et al., 2008). Em glândulas salivares plenamente desenvolvidas, o suprimento sanguíneo é determinante para se manter o fluxo de água necessária à síntese de saliva (Nanci, 2013).

Ainda, a inervação simpática e parassimpática é majoritariamente responsável pela atividade dos vasos sanguíneos que irrigam glândulas salivares ocasionando vasoconstrição ou vasodilatação dependendo do neurotransmissor em ação (Anderson; Garrett, 1998; Proctor; Carpenter, 2007). Da mesma forma, fibras nervosas autonômicas podem influenciar a atividade de células progenitoras durante o processo de organogênese (Lombaert et al., 2011).

Assim, identificar o período inicial do desenvolvimento mioepitelial, endotelial e nervoso durante a formação das glândulas salivares, correlacionando tais mecanismos com a expressão de canais de água, pode ser determinante às aplicações terapêuticas como regeneração e substituição glandulares (Porcheri; Mitsiadis, 2019).

As aquaporinas 1, 3 e 5, expressas durante o desenvolvimento das glândulas salivares humanas teriam relação com o desenvolvimento de importantes elementos epiteliais glandulares como as células mioepiteliais e estruturas vasculares e nervosas, essenciais tanto no período de maturação da arquitetura

epitelial quanto no processo de síntese e secreção salivar de glândulas totalmente desenvolvidas?

Diante dos importantes reflexos da deficiência de saliva ou da qualidade de sua composição à homeostase oral, este trabalho visa contribuir com a compreensão do desenvolvimento das glândulas salivares humanas, correlacionando vias essenciais à síntese, estímulo e secreção salivar por meio de análise da expressão dos canais de água, células mioepiteliais e redes vasculares e neurais durante o processo de desenvolvimento glandular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GLÂNDULAS SALIVARES

2.1.1 O desenvolvimento das glândulas salivares

O início da morfogênese ocorre em períodos distintos entre glândulas salivares maiores e menores. O processo formação glandular, no entanto, é similar e se inicia por meio da interação entre o epitélio oral primitivo e mesênquima subjacente, envolvendo complexas e dinâmicas etapas proliferativas, de polarização e morte celular, bem como migração e diferenciação de células progenitoras que comporão a arquitetura glandular. A evolução tecidual destes órgãos secretores também são coordenados ativamente por estruturas neuronais e endoteliais desde as fases iniciais de desenvolvimento até que atinjam arquitetura funcional, representada por ácinos e ductos capazes de produzir e secretar a saliva para o interior da cavidade oral (Lourenço; Kapas, 2005; Patel et al., 2006; de Paula et al., 2017a).

O início do desenvolvimento das glândulas salivares ainda é controverso na literatura. Em seres humanos, as glândulas parótidas são as primeiras detectadas durante a embriogênese, temporalmente entre a 4ª e 6ª semana de vida intrauterina (Nanci, 2008). A seguir, as glândulas submandibulares desenvolvem-se a partir do final da 6ª semana, finalmente seguidas pelas glândulas sublinguais, que começam a se formar entre a 7ª e 8ª semana de vida embrionária. Já as glândulas salivares menores, têm classicamente o seu início relatado a partir do 3º mês de gestação, entre a 8ª e 12ª semana do desenvolvimento (Ellis; Auclair, 2008; Nanci, 2008).

Embora mais recentemente alguns autores já tenham descrito rudimentos das glândulas salivares humanas identificados entre a 4ª e 12ª semana de desenvolvimento (Porcheri; Mitsiadis, 2019), Togni et al. (2019) indicam que a morfogênese glandular tem início apenas na 6ª semana de vida intrauterina, sendo os distintos tipos glandulares originados do ectoderma (Togni et al., 2019). Após o

nascimento, as glândulas salivares continuam se desenvolvendo e atingem a sua maturação funcional (Nanci, 2008).

As glândulas salivares dos mamíferos apresentam similaridades acerca de sua fisiologia, anatomia e histologia, e por isso, a grande maioria dos estudos que trouxeram avanços substanciais no entendimento da estrutura e funcionamento do órgão foi realizada em roedores menores, principalmente em camundongos por serem um modelo experimental clássico. Baseando-se nesse modelo, o desenvolvimento das glândulas salivares foi descrito em cinco estágios, sendo estes o estágio de pré-botão, botão inicial, pseudoglandular, canalicular e botão terminal (Figura 2.1) (Melnick; Jaskoll, 2000; Tucker, 2007).

O estágio pré-botão é a primeira fase do desenvolvimento, onde ocorre um espessamento local do epitélio oral primitivo, em sítio tecidual previamente determinado por genes específicos onde a estrutura glandular iniciará sua formação. Partindo desse espessamento, as células do epitélio se proliferam em direção ao mesênquima subjacente, formando os primeiros botões glandulares que caracterizam o estágio de botão inicial. Tais botões mantêm-se conectados ao epitélio oral de origem, coligados por estruturas que posteriormente se tornarão ductos. A partir desta fase, os botões epiteliais sofrem ramificações que produzem em torno de quatro a cinco novos botões, dando lugar ao estágio pseudoglandular (Melnick; Jaskoll, 2000; Tucker, 2007; Teshima et al., 2016). Neste estágio, os ductos ainda se encontram como cordões sólidos e começam a exibir pequenas cavitações por morte celular na região central originando o espaço luminal (Teshima et al., 2016).

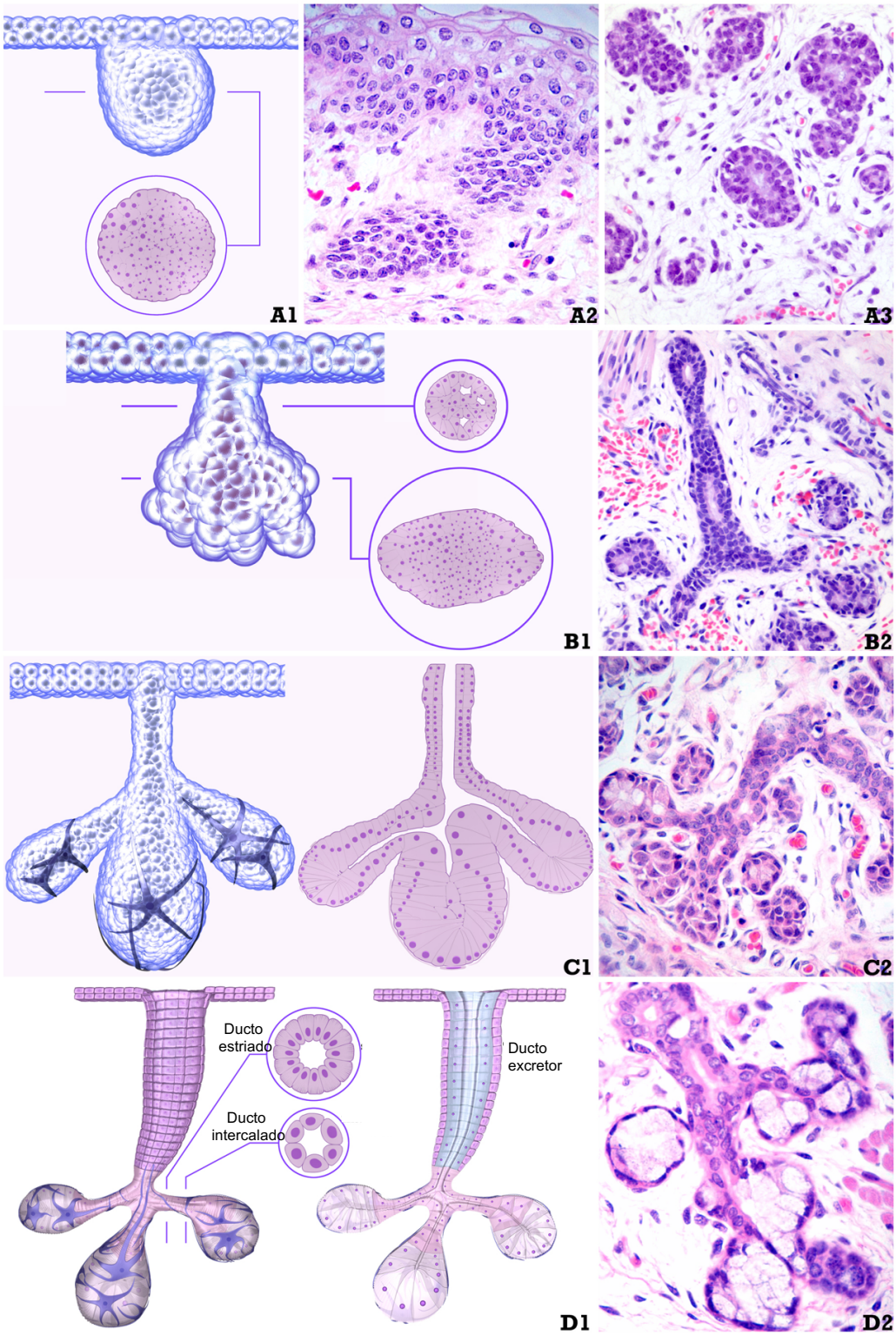
Com a progressão de ramificações do tecido epitelial, a morfogênese das glândulas salivares atinge o estágio canalicular, em que o ducto principal por onde a saliva passará antes de atingir o interior da cavidade oral se encontra cavitado e a abertura luminal é evidente, conectada aos botões acinares. Com isso, o estágio de botão terminal é então atingido, apresentando uma rede complexa de ductos e inúmeros ácinos secretores diferenciados (Melnick; Jaskoll, 2000; Tucker, 2007; Teshima et al., 2016).

Para que o desenvolvimento das glândulas salivares ocorra, numerosas interações entre epitélio e mesênquima, onde diversas vias de sinalização e fatores de crescimento estão presentes, atuam como guias moleculares às células

progenitoras epiteliais nos diversos estágios de histodiferenciação e maturação glandular. Nesse contexto, células progenitoras neuronais e vasculares são também essenciais à organogênese (Patel; Hoffman, 2014). Desta maneira, o desenvolvimento de glândulas salivares funcionais somente ocorre com o importante auxílio das células progenitoras mesenquimais (Tucker, 2007).

A figura 2.1 ilustra os estágios do desenvolvimento das glândulas salivares humanas com suas respectivas imagens histológicas.

Figura 2.1 – Representação esquemática dos estágios do desenvolvimento das glândulas salivares e suas respectivas imagens histológicas



Fonte: adaptado de de Paula et al. (2017a).

O primeiro estágio observado é caracterizado pela formação de um sólido botão epitelial oriundo do epitélio oral, denominado estágio de botão inicial **(A)**; a progressiva proliferação epitelial origina botões e estruturas ductais iniciais com cavitações luminais primitivas, conhecido como estágio pseudoglandular **(B)**; a expansão dos botões epiteliais e dos espaços luminais ao longo do ducto ocorre no estágio canalicular **(C)**; diferenciação acinar final, denominada botão terminal, caracterizada pela formação de estruturas funcionais ligadas a uma rede ductal estabelecida **(D)**.

2.1.2 Glândulas salivares maiores e menores

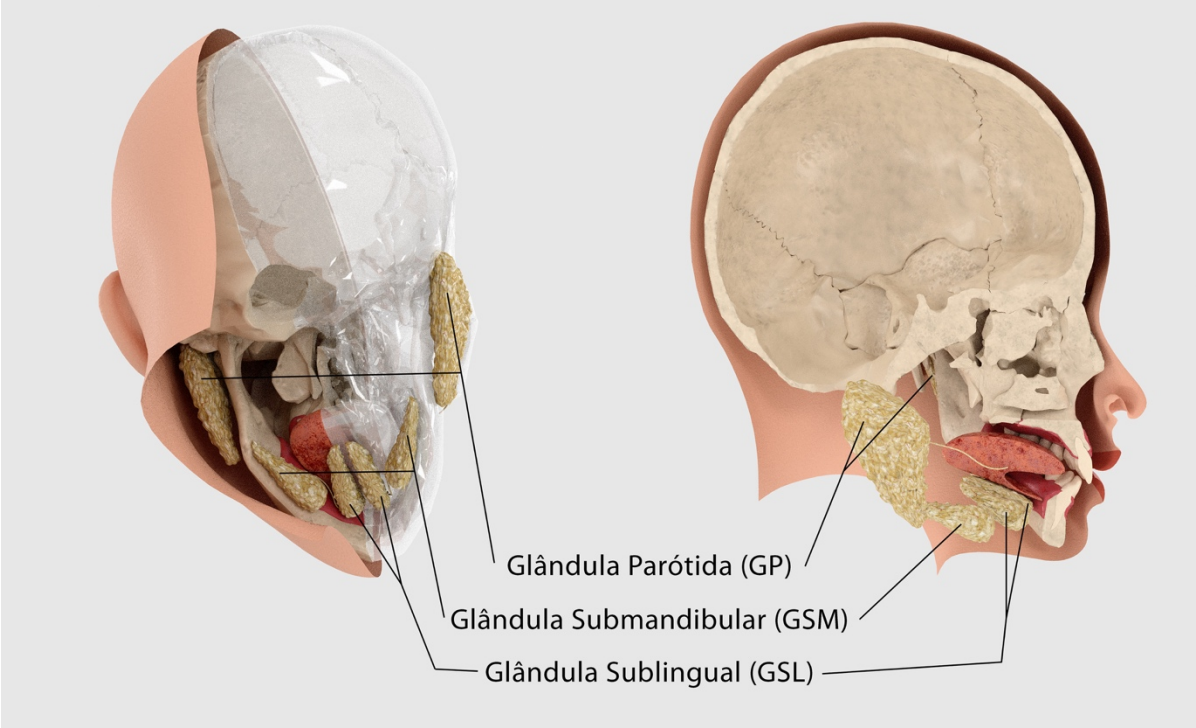
Os seres humanos possuem 3 pares de glândulas salivares principais representadas pelas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais. Juntas, elas são responsáveis por cerca de 90% do total de síntese salivar, além das glândulas salivares menores, distribuídas na cavidade oral (Amano et al., 2012; Holmberg; Hoffman, 2014).

Anatomicamente, a maior glândula salivar é a parótida (GP). Localizada entre o ramo da mandíbula e o processo mastóide, a GP é intimamente associada ao nervo facial. Possui formato piramidal, seu ápice estende-se além do ângulo da mandíbula e sua base está próxima ao meato acústico interno. Os ácinos que compõem a glândula parótida são serosos e produzem um fluido salivar proteico. O ducto da glândula parótida é denominado ducto de Stensen e localiza-se na mucosa jugal próximo à região do segundo molar superior (Berkovitz et al., 1992; Avery, 2005).

A glândula submandibular (GSM) está localizada na região de assoalho bucal, próxima à borda inferior da mandíbula. Sua composição de ácinos serosos e mucosos resultam na produção de uma saliva mista (predominantemente serosa) e seu ducto principal é denominado conduto de Wharton, localizado na região ventral da língua (Berkovitz et al., 1992; Avery, 2005).

A glândula sublingual (GSL), por sua vez, encontra-se próxima à glândula submandibular, no assoalho da cavidade bucal. A saliva produzida por esse tipo glandular é mista (predominantemente mucosa), já que a glândula sublingual também é constituída por um grupo de 8-30 glândulas salivares menores, em que cada uma apresenta seu próprio sistema de ductos que desembocam na prega sublingual (Berkovitz et al., 1992; Avery, 2005) denominados ductos de Rivinus (Holmberg; Hoffman, 2014). A posição anatômica das glândulas salivares humanas maiores é exemplificada na figura 2.2.

Figura 2.2 – Representação esquemática das glândulas salivares maiores



Fonte: a autora.

Glândula parótida evidenciando a maior estrutura, anatomicamente exibe formato piramidal; glândula submandibular, a segunda maior porção dentre as glândulas salivares maiores localizada próximo a borda inferior da mandíbula e glândula sublingual, posicionada próximo à glândula submandibular também no assoalho bucal.

Ainda, múltiplas glândulas salivares menores (GM) estão presentes em quase toda a cavidade oral. Trata-se de pequenas unidades formadas por ácinos de predomínio mucoso, os quais podem apresentar, ocasionalmente, semiluas serosas. Glândulas menores localizadas em regiões de palato, língua e lábios são consideradas por alguns autores, glândulas puramente mucosas, com exceção das glândulas salivares de Von Ebner localizadas papilas valadas da língua, de constituição acinar serosa. Do total de saliva secretada, 6 a 10% do fluido salivar é oriundo das glândulas menores, onde é estimada cerca de 70% do total de mucinas (Ferraris; Munõz, 2006). O aumento de secreção das glândulas salivares menores pode ocorrer por também por estímulos do paladar (Speirs, 1984).

2.1.3 Histologia das glândulas salivares maiores e menores

As glândulas salivares são fundamentalmente compostas por três tipos de células epiteliais conhecidas como células acinares, ductais e mioepiteliais. As estruturas acinares (ou adenômeros) são classificadas como ácinos serosos ou mucosos, de acordo com o tipo de secreção que produzem em seus grânulos intracelulares. Algumas glândulas salivares apresentam lóbulos acinares mistos, secretando uma saliva seromucosa, cujas proporções variam entre os tipos glandulares (Avery, 2005; Delporte et al., 2016).

Os ácinos serosos possuem células pequenas em formato piramidal e núcleo esférico no terço basal da célula. Este tipo acinar possui numerosos grânulos de secreção no citoplasma apical (Avery, 2005; Delporte et al., 2016), enquanto as células mucosas consistem em células maiores, morfologia colunar e núcleo achatado comprimido contra a face basal da membrana (Berkovitz et al., 2004; Avery, 2005; Ferraris; Munõz, 2006). Danos relacionados às estruturas acinares podem levar à sensação de boca seca ou xerostomia, sintoma relacionado a eventos degenerativos das glândulas salivares e frequentemente observado em pacientes tratados com radiação para câncer de cabeça e pescoço bem como Síndrome de Sjögren (Shubin et al., 2020).

O sistema de ductos que compõem a estrutura funcional das glândulas salivares é responsável por drenar o fluido salivar secretado pelos ácinos até a cavidade oral. Além disso, é fundamental para adequar a composição salivar através de seus diferentes tipos de ductos (Figura 2.3). As porções ductais mais próximas aos ácinos são conhecidas como ductos intercalados, constituídos por células cuboides e envolvidos pelas longas projeções das células mioepiteliais. Esta porção ductal geralmente é mais ampla em glândulas salivares de predomínio seroso (Ferraris; Munõz, 2006), seguida de ductos estriados que se formam na confluência de diversos ductos intercalados. Estes são compostos, por sua vez, por células colunares ricas em mitocôndrias, o que conferem um aspecto estriado a esses ductos. Finalmente, o ducto excretor é a porção final que participa também de forma ativa no processo de troca iônica entre a saliva inicial isotônica e o

conteúdo extracelular, de modo a formar uma saliva hipotônica apta para ser secretada na mucosa bucal (Ferraris; Munõz, 2006; Delporte et al., 2016).

Ainda, as células mioepiteliais (CMEs) são estruturas contráteis baseadas em filamentos musculares capazes de comprimir e fortalecer os ácinos glandulares, podendo estender-se até as porções ductais intercalares. Com a contração das células do parênquima, as células mioepiteliais auxiliam na expulsão da saliva para o interior da cavidade oral (Redman, 1994; Delporte et al., 2016). Encontrada nos tecidos exócrinos (Ozdemir et al., 2017), as células mioepiteliais localizam-se entre a lâmina basal e as células ductais e acinares das glândulas salivares (Redman, 1994). Durante os estágios de ramificação e diferenciação das glândulas submucosas pulmonares de camundongos, sugere-se que estas células também se caracterizam como células progenitoras, originando estruturas acinares seroras e mucosas, além de células ductais (Carraro; Stripp, 2017).

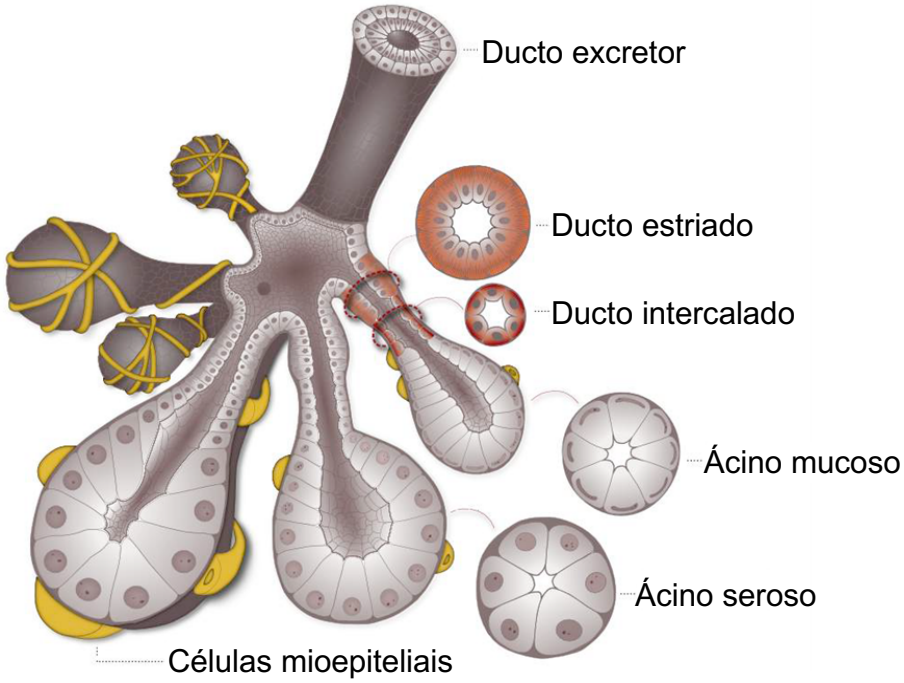
Os primeiros indícios de formação das células mioepiteliais são observados no epitélio glandular antes mesmo da diferenciação das células acinares e ductais, já entre a 10° e a 18° semana de vida intrauterina. Entre a 19° e 24° semana, diferenciam-se e expressam filamentos de actina. Com as alterações na extensão citoplasmática, essas células começam a se posicionar na porção basal de ductos ácinos. O período de maturação efetiva das CMEs nas glândulas salivares ocorre entre a 25° e 32° semana, adquirindo morfologia dendrítica, achatada e tornando-se mais evidentes. No estágio final de desenvolvimento, entre a 33° e 40° semana, as células mioepiteliais se proliferam e adquirem capacidade contrátil (Shah et al., 2016). Acredita-se que as células mioepiteliais sejam oriundas do ectoderma e possuam diferentes morfologias nos ductos, onde tem características fusiformes circundando estruturas ductais. Já o mioépitelio que envolve os ácinos tem fenótipo estrelado, apresentando prolongamentos citoplasmáticos que envolvem as unidades acinares (Oh; Moon, 2019).

A actina é um importante componente citoplasmático da célula mioepitelial (Hardy; Kramer, 1998). Durante o desenvolvimento, as primeiras diferenciações da célula mioepitelial em glândulas salivares maiores de ratos foram identificadas por meio dos anticorpos calponina e alfa-actina de músculo liso, que hoje representam ferramentas importantes na investigação imunoistoquímica do mioepitélio glandular (Ogawa et al., 1999). Além de capacidade contrátil, as células mioepiteliais possuem

outras funções como transporte de metabólitos, formação e manutenção da membrana basal, manutenção da permeabilidade glandular e supressão tumoral (Shah et al., 2016).

Ainda, as células mioepiteliais possuem funções sensoriais (Shah et al., 2016) uma vez que neuroefetores hipolemais, localizados dentro da membrana basal do parênquima glandular e epilemais, localizados fora da membrana basal do epitélio glandular, se comunicam com as células mioepiteliais e do parênquima das glândulas salivares, atuando em diferentes intensidades para cada tipo glandular (Garret; Kidd, 1993). A ilustração da histologia das células serosas e mucosas, ductos intercalares, estriados e excretores, bem como das células mioepiteliais é exemplificada na figura 2.3.

Figura 2.3 - Figura esquemática da glândula salivar totalmente desenvolvida ilustrando células parenquimatosas em detalhe.



Fonte: Adaptado de de Paula et al. (2017a).

O esquema ilustra uma glândula salivar secretora mista (ácinos serosos e mucosos). Os ácinos serosos secretam uma saliva mais aquosa e são compostos por células de morfologia piramidal com núcleo esférico, enquanto ácinos mucosos são identificados com núcleos comprimidos na região basal, estruturas mais alongadas e alta produção de muco no citoplasma acinar. Diretamente conectados as unidades secretoras, estruturas ductais intercalares possuem uma parede constituída de única camada epitelial cuboidal, seguidos por ductos estriados, importantes porções que realizam troca iônica entre a matriz extracelular e o líquido salivar primário através de suas estrias ou dobramentos de membrana identificados em sua face basal. A última porção ductal é constituída pelo ducto excretor, conectado à mucosa oral, responsável pelo transporte da saliva à boca. As células mioepiteliais possuem extensões celulares que envolvem as estruturas acinares e os ductos intercalares, auxiliando mecanicamente a expulsão do conteúdo salivar para a rede ductal e, finalmente, para o interior da cavidade oral.

2.2 VASCULARIZAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Durante o período de embriogênese, na fase de gastrulação, o mesoderma é o folheto germinativo que dá origem ao tecido precursor das células hematopoiéticas (Risau; Flamme, 1995). Com isso, células endoteliais diferenciadas do tecido mesodermal se proliferam e migram formando estruturas de tecido vascular num processo denominado angiogênese. A rede vascular consiste de uma ramificação formada por capilares, veias e artérias (Larrivée et al., 2009).

O suprimento vascular exerce funções críticas no desenvolvimento de diversos órgãos (Lammert et al., 2003; Brunskill; Potter, 2010) e, embora a formação da vasculatura seja responsável pela nutrição e oxigenação de tecidos e, por isso, essencial ao desenvolvimento e diferenciação do organismo (Larrivée et al., 2009), a compreensão de mecanismos moleculares pelos quais tubo e lúmen de vasos sanguíneos são formados é ainda restrita (Jin et al., 2005).

Da mesma forma, as vias de sinalização responsáveis por guiar vasos sanguíneos e os fatores que estimulam diferentes padrões de ramificação da microvasculatura em diferentes órgãos e tecidos ainda não estão totalmente elucidadas (Larrivée et al., 2009). Sabe-se, no entanto, que a migração endotelial ocorre com auxílio da regulação de actina, filamentos intermediários e microtúbulos que, por meio de vias específicas, sinalizam para que o remodelamento do citoesqueleto ocorra. Para que a migração celular seja efetiva, as células do tecido endotelial tendem a distender-se e contrair-se (Lamalice et al., 2007).

Vasos sanguíneos das glândulas salivares recebem estímulo da inervação autônoma. Fibras vasoconstritoras simpáticas podem não exercer controle direto nos reflexos de salivação quando relacionada diretamente aos vasos sanguíneos, auxiliando na regulação da vascularização geral. Por outro lado, reflexos parassimpáticos conduzem a vasodilatação dos vasos sanguíneos, auxiliando o processo de secreção salivar (Garret, 1987). Quanto aos estímulos, *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) e acetilcolina causam vasodilatação, enquanto adenosina trifosfato, neuropeptídeo Y (NPY) e norepinefrina atuam como vasoconstritores (Sheng; Zhu, 2018).

Axônios simpáticos e parassimpáticos comunicam-se com os vasos sanguíneos salivares via inervações epilemais (Garret; Kidd, 1993). A irrigação das glândulas salivares ocorre via ramificações vasculares que originam uma rede capilar profusa enovelando ácinos e porções ductais intralobulares. O fornecimento de sangue, crucial à homeostase de cada órgão, é especialmente requerido ao processo de síntese salivar, fornecendo grande quantidade de água por meio de um ultrafiltrado do plasma sanguíneo (Dodds et al., 2005; Ferraris; Munõz, 2006; Stamers et al., 2010).

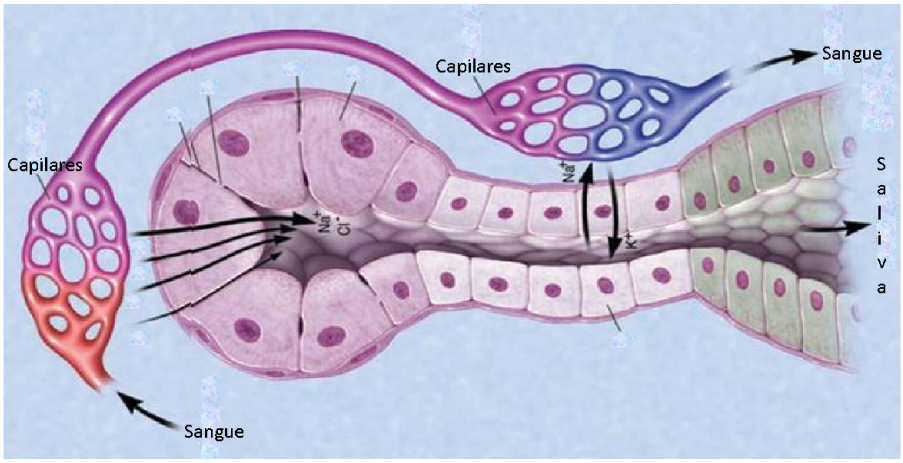
Especificamente, a glândula parótida é irrigada pela artéria carótida externa enquanto a glândula submandibular tem acesso à vascularização arterial via ramos da artéria lingual e facial e glândulas sublinguais são irrigadas pelas artérias submental e sublingual (Li et al., 2007; Katchburian; Arana, 2017). Já as glândulas salivares menores da língua e assoalho bucal recebem suprimento sanguíneo através das artérias linguais, lábios são irrigados por ramos labiais das artérias faciais e palato e região jugal, por ramos da artéria maxilar (Berkovitz et al., 2004).

Em glândulas salivares, axônios simpáticos estendem-se ao longo do sistema vascular; nesse contexto, as endotelinas derivadas da rede sanguínea servem como guia para os neurônios simpáticos (Makita et al., 2008). Além disso, as endotelinas também afetam a função da glândula salivar adulta, onde experimentos realizados com ratos evidenciaram que sua liberação local modula a regulação autonômica da secreção salivar. Tais achados destacam que fatores de orientação axonal derivados do endotélio controlam a inervação simpática da glândula submandibular (Ventimiglia et al., 2011).

Foi recentemente descrito que a rede vascular se desenvolve analogamente ao epitélio das glândulas salivares durante a morfogênese de ramificação e a ausência de vascularização durante o desenvolvimento promove a formação de estruturas acinares e ductais dismórficas (Kwon et al., 2017). Com as glândulas já plenamente formadas, a vasculatura fornece substratos importantes para as estruturas glandulares, sendo essencial na promoção de trocas entre membranas que garantem a síntese do fluido salivar (Proctor; Carpenter, 2007).

A figura 2.4 ilustra o fornecimento de substratos oriundos de um ultrafiltrado sanguíneo necessários à síntese de saliva pelo epitélio glandular.

Figura 2.4 - Esquema ilustrando o mecanismo de fornecimento de água e diversos substratos realizados pela rede microvascular e sua comunicação com ácinos e ductos da glândula salivar

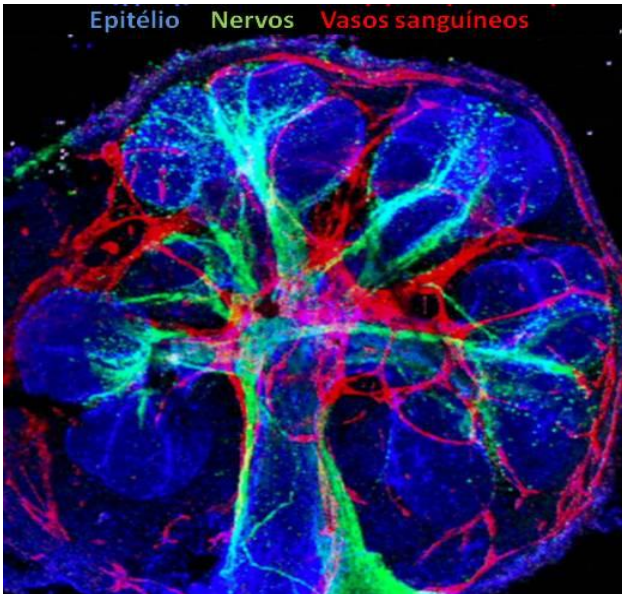


Fonte: adaptado de Lee et al. (2009).

Vasos sanguíneos e fibras nervosas podem compartilhar similaridades estruturais e anatômicas, podendo desenvolver-se em redes paralelas (Larrivée et al., 2009).

A figura 2.5 ilustra, em glândula submandibular (GSM) de camundongo no 13º dia embrionário, a complexa rede microvascular e de fibras nervosas autonômicas que se entrelaçam e enovelam o parênquima glandular, permitindo o fornecimento de substratos oriundos de um ultrafiltrado sanguíneo necessários à síntese de saliva.

Figura 2.5 - Figura ilustrando a rede entrelaçada de vasos sanguíneos (vermelho) e nervos (verde) no epitélio glandular submandibular (azul) de camundongo durante o período de embriogênese (E13)



Fonte: Adaptado de Holmberg e Hoffman (2014).

2.3 INERVAÇÃO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Tanto vasos sanguíneos derivados do mesoderma, quanto células neurais derivadas do ectoderma iniciam contato através da crista neural (Acevedo et al., 2015). Sinais gerados de fibras nervosas aferentes dos nervos trigêmeo, facial e glossofaríngeo ocorrem por estímulos orais de paladar e mecanicamente como na mastigação (Proctor, 2016). A inervação simpática e parassimpática participa da regulação do diâmetro dos vasos sanguíneos enviando sinais que permitem o tensionamento e contratibilidade da parede vascular (David; Llewellyn-Smith, 2010; Sheng; Zhu, 2018). O parênquima glandular e suas células mioepiteliais podem sofrer comunicação neuroefetora hipolêmica, onde a sinapse ocorre dentro da membrana celular que constitui o parênquima glandular e epilêmica, quando a comunicação sináptica ocorre fora da membrana basal epitelial (Garrett; Kidd, 1993).

Proctor (2016) resumiu, em sua excelente revisão, a inervação das glândulas salivares, onde o suprimento nervoso das glândulas parótidas ocorre via fibras nervosas eferentes no ramo timpânico do nervo glossofaríngeo para fibras pós-ganglionares no nervo aurículo-temporal e para o gânglio ótico. Interneurônios originados do nervo facial, que inerva o núcleo do trato solitário, chegam ao núcleo salivar superior da medula oblongata. Da mesma maneira, do núcleo salivar inferior da medula oblongata ocorrem sinapses do nervo glossofaríngeo. Partindo dos núcleos salivares, por meio do nervo da corda do tímpano, fibras nervosas eferentes carreiam sinais para o gânglio submandibular e em seguida, para as glândulas submandibulares e sublinguais. Ainda, os nervos palatino, lingual e ramo bucal do nervo mandibular se comunicam via fibras nervosas parassimpáticas que inervam glândulas salivares menores espalhadas no interior da cavidade oral (Proctor, 2016).

Todas as glândulas salivares são inervadas por feixes parassimpáticos e a maioria das glândulas, também por nervos simpáticos (Proctor; Carpenter 2007). Embora amplamente estudada nos dias atuais, pouco se sabe sobre o papel do sistema nervoso autônomo e sua comunicação com o epitélio das glândulas salivares durante o desenvolvimento, ou mesmo como esta inervação influencia na

organogênese celular dessas estruturas (Ferreira; Hoffman, 2013). Sabe-se, no entanto, que a inervação parassimpática é crucial à regeneração epitelial (Knox et al., 2013) e organogênese das glândulas salivares (Knox et al., 2010), sendo também importante na regulação do processo de tubologênese epitelial (Nedvetsky et al., 2014).

Ainda, o microambiente que circunda e sustenta as células progenitoras durante a morfogênese é essencial ao desenvolvimento estrutural glandular adequado, bem como sua manutenção e diferenciação (Joo et al., 2016). Com isso, atribui-se à inervação autônoma importantes funções tanto no desenvolvimento das glândulas salivares, quanto na homeostase de suas funções (Proctor; Carpenter, 2014).

Embora tais eventos citados por Knox et al. (2010, 2013), Joo et al. (2016) e Emmerson et al. (2017) tenham sido comprovados em modelos animais, Katori et al. (2013) sugerem que, também durante o desenvolvimento fetal humano, o suprimento nervoso contribua com a morfologia da glândula submandibular, uma vez que fibras nervosas são abundantemente distribuídas neste epitélio tipo epitelial formação.

Mais recentemente, Loy et al. (2020) sugeriram que glândulas sublinguais obtém estímulos nervosos simpáticos, além de comunicação parassimpática em parênquima acinar mucoso e seromucoso. Isso porque, durante a realização de exercícios físicos onde há alta atividade simpática, ocorre também potencial secreção de mucina no fluido salivar (Loy et al., 2020). O principal neurotransmissor secretado pelos nervos colinérgicos parassimpáticos é a acetilcolina, já os nervos simpáticos secretam principalmente noradrenalina (Proctor; Carpenter, 2007), sendo que estes são estocados em pequenas vesículas (Garret; Kidd, 1993).

Quando acetilcolina se liga à receptores M1 e M3 muscarínicos (Proctor; Carpenter, 2007), promove abundante fluxo salivar (Ekström, 1989). Já as terminações simpáticas liberam o neurotransmissor norepinefrina (também chamada noradrenalina) (Garrett; Kidd, 1993), ativando receptores α1 adrenérgicos (Ishikawa; Ishida, 2000) e promovendo diminuição do fluxo de saliva rica em proteínas (Ekström, 1989). Alguns peptídeos também auxiliam no reflexo de secreção salivar como substância P e *vasoactive intestinal peptide* (VIP) (Ekström et al., 1989).

Fibras nervosas de glândulas salivares maiores podem estar expressas de formas distintas (Ekström et al., 1989). Além da variável contribuição nervosa para cada tipo glandular, sabe-se que, em geral, a influência de inervação sobre o parênquima glandular pode regular diferentes processos como níveis tróficos, onde funcionamento normal e tamanho do parênquima são preservados; processos proteocinéticos, regulam a secreção proteica, hidrocinético, responsável pela mobilização da água, bem como processos sintéticos, que induzem a síntese de variados substratos (Garrett; Kidd, 1993).

Para que a saliva seja produzida, o transporte de água entre as membranas ocorre com o auxílio de alguns membros de uma família de proteínas de canais de membranas chamada aquaporinas (AQPs) (Ishikawa; Ishida, 2000).

2.4 AQUAPORINAS

As aquaporinas são expressas em diferentes órgãos e na maioria das glândulas endócrinas e exócrinas de mamíferos (Delporte, 2017), sendo representadas por uma família de proteínas transmembrânicas, cruciais na regulação do fluxo de água e pequenos solutos como glicerol e ureia (Day et al., 2014; Li; Wang, 2017). Inicialmente identificadas somente como canais de água e recentemente relatada como proteína responsável por mediar também o transporte de H_2O_2 participante em respostas imunes (Wang et al., 2020), as AQPs foram descritas ainda em meados de 2019 como uma família composta por 13 membros (Abir-Awan et al., 2019), teve identificada, no entanto, um novo membro, somando portanto 14 diferentes proteínas transmembrânicas de canais de água (Chauvigné et al., 2019).

Destas, 3 subfamílias são descritas de acordo como tipo de transporte realizado. As aquaporinas 0, 1, 2, 4, 5, 6, 8 são capazes de transportar somente moléculas de água, enquanto as aquagliceroporinas 3, 7, 9 e 10, são seletivas também a pequenos solutos como ureia e glicerol e por fim, as superaquaporinas 11 e 12 não tem seu papel de transporte transmembrânico totalmente elucidado

(Ishibashi et al., 2009; Ishibashi et al., 2014; Zhu et al., 2015; Moeller et al., 2016, Ishibashi et al., 2017). A última aquaporina descrita (AQP14), foi identificada como proteína responsável por facilitar o carreamento de água, amônia, glicerol, ureia e H2O2 (Chauvigné et al., 2019).

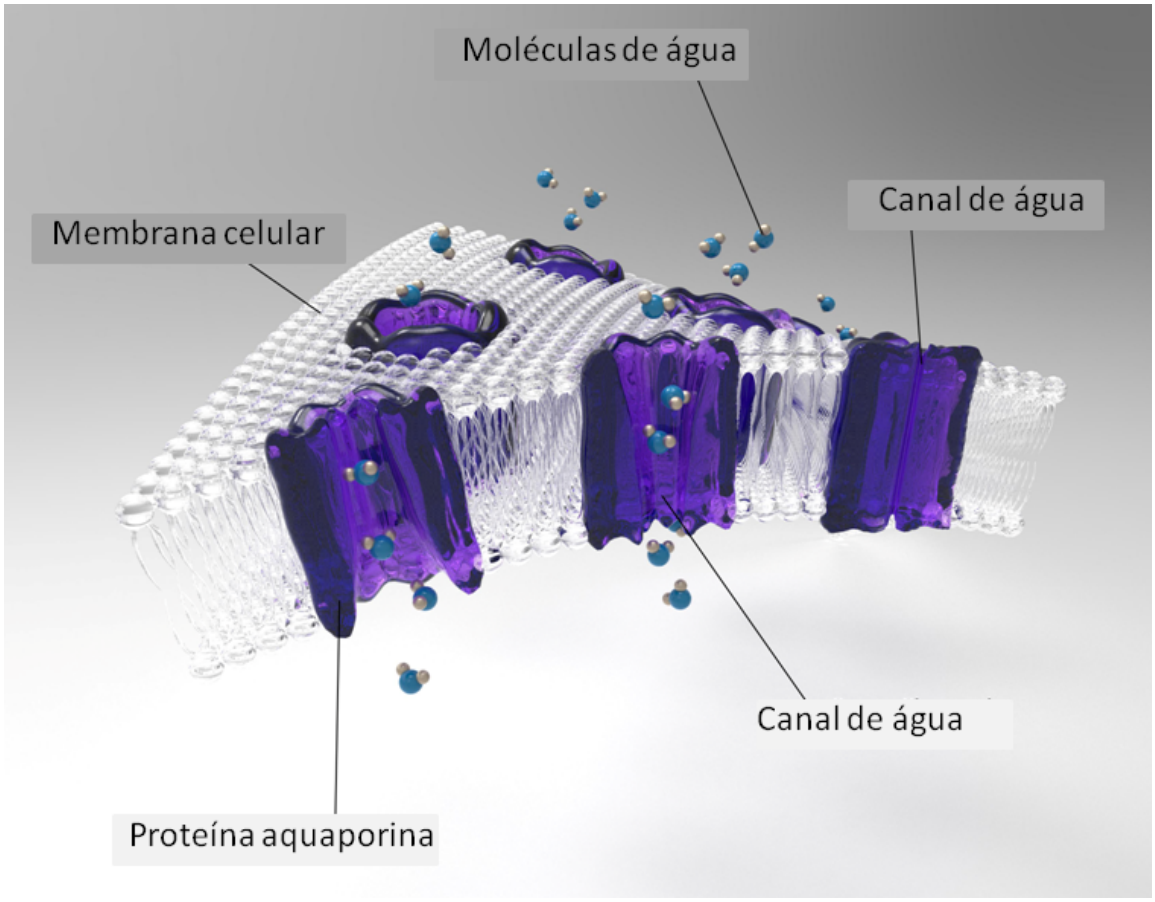
Sabe-se hoje que as AQPs podem participar do desenvolvimento anatômico e fisiológico das glândulas salivares uma vez seu padrão de expressão é específico e sua atuação pode variar durante a embriogênese das glândulas salivares de camundongos (Larsen et al., 2009).

Diversos estudos consideram que as AQPs 1, 3 e 5 sejam as proteínas mais relevantes expressas na glândula salivar (Gresz et al., 2001; Larsen et al., 2009; Wang et al., 2009; de Paula et al., 2017b) sendo que a AQP5 exerce uma papel central no processo de permeabilização das células acinares sendo determinante na composição e quantidade de saliva secretada (Krane et al., 2001; Larsen et al., 2011). As AQPs 4, 6, 7, 8, 9 e 11, no entanto, são AQPs relatadas como expressas nas glândulas salivares (Yang et al., 2005; Welner et al., 2006; Ichikawa et al., 2009; Larsen et al., 2010; Aure et al., 2014;).

Variando de acordo com o tipo de transporte exercido por cada aquaporina, sua estrutura genética e sequência homologa, as AQPs podem ser reguladas por mediação de estímulos hormonais e/ou neurotransmissores, ou ainda em diferentes tipos celulares por serem expressas de maneira constitutiva nas membranas basolaterais (Ishikawa; Ishida, 2000; Day et al., 2014). Ainda, as aquaporinas podem regular processos cruciais à resposta inflamatória celular (Sisto et al., 2019).

A figura 2.6 ilustra poros na bicamada fosfolipídica da membrana plasmática formados pelas proteínas de canais de água AQPs atuantes nas glândulas salivares, o que facilita a passagem de água entre os meios extra e intracelulares, regulando a permeabilidade transmembrânica e facilitando a síntese e secreção de saliva.

Figura 2.6 - Esquema ilustrando a localização celular das proteínas de canais de água aquaporinas atuantes no parênquima de glândulas salivares



Fonte: adaptado de de Paula et al. (2017b).

Localizadas na bicamada fosfolipídica da membrana plasmática, as AQPs formam poros na membrana celular funcionando como um canal água entre os meios extra e intracelulares.

2.4.1 Aquaporina 1 (AQP1)

A proteína de canal de água AQP1 é identificada em barreiras endoteliais de diversos tecidos, sendo descrita também como proteína expressa nos ductos pancreáticos, plexo coroide, córtex renal, vesícula biliar, fígado, ânus, células ependimárias do sistema nervoso central e hipocampo (Mobasheri; Marples, 2004), além de glândulas salivares (Ma et al., 1999;).

Amplamente descrita nas membranas endoteliais vasculares (Verkman, 2002), AQP1 exerce seu papel no transporte passivo de água nos vasos

sanguíneos, aumentando a permeabilidade das membranas celulares à agua por meio de poros e impulsionando, desta forma, o transito aquoso pelo gradiente osmótico (Verkman, 2002; Hara-Chikuma; Verkman, 2006).

Durante o período de desenvolvimento, alguns estudos descrevem a expressão da proteína AQP1 nas glândulas salivares humanas (de Paula et al., 2017b), de camundongos (Larsen et al., 2009) e ratos (Akamatsu et al., 2003). A descrição específica dos sítios de expressão da AQP1 em glândulas totalmente desenvolvidos foi relatada nas células endoteliais e mioepiteliais do epitélio glandular humano (Gresz et al., 2001; Beroukas et al., 2002) e de camundongos (Nakamura et al., 2013). A expressão de AQP1 não foi identificada, no entanto, no parênquima acinar e ductal em ambos os modelos.

Por outro lado, além de expressa no tecido endotelial nas diversas fases do desenvolvimento de glândulas salivares humanas maiores e menores, AQP1 foi também foi identificada de maneira difusa em estruturas epiteliais acinares nos estágios mais iniciais do desenvolvimento (fases de botão e pseudoglandular) por meio de imunoistoquímica (de Paula et al., 2017b). Ainda, durante o ciclo celular, AQP1 tem papel no processo de divisão, uma vez que essas proteínas facilitam a regulação do volume celular, associando-se também a superexpressão desta proteína à proliferação, uma vez que esta facilita o transporte de substratos necessários ao ciclo celular (Galán-Cobo et al., 2016).

2.4.2 Aquaporina 3 (AQP3)

A AQP3 faz parte da subfamília aquagliceroporina, uma vez que transporta, além de água, glicerol e outros pequenos solutos (Agre, 2006; Calamita et al., 2018). Nas células epiteliais humanas, AQP3 é considerada uma proteína crucial atuando no processo de transporte e regulação do volume de água celular (Kida et al., 2005). Já se demonstrou que esta proteína é expressa em queratinócitos da camada basal

da epiderme (Hara-Chikuma et al., 2009) e a elevada expressão de AQP3 nas membranas basolaterais de diversos órgãos do corpo humano sugere que esta proteína exerça importante função nos processos de hidratação e homeostase (Mobasheri et al., 2005).

No processo de proliferação celular a AQP3 pode estar ligada à alterações de genes necessários ao processo de divisão, bem como a substratos de renovação celular (Galán-Cobo et al., 2015). Diversas pesquisas associam a expressão de AQP3 a diferentes tumores (Cao et al., 2013; Chen et al., 2014; Wang et al., 2019), sendo esta considerada marcador prognóstico, uma vez que o aumento da expressão de AQP3 em paciente com câncer de mama representou evidências de evolução das células neoplásicas com aumento de metástase, tamanho e recidiva local do tumor (Zhu et al., 2018).

Particularmente nas glândulas salivares, a AQP3 é uma proteína amplamente expressa (Gresz et al. 2001; Larsen et al., 2009; Nakamura et al., 2013; Aure et al., 2014; de Paula et al., 2017b; Ichiyama et al., 2018). Nas glândulas salivares humanas adultas (Gresz et al., 2001) e em desenvolvimento (de Paula et al., 2017b), AQP3 é expressa nas membranas basolaterais das células acinares. A expressão de AQP3 foi também identificada no epitélio ductal interlobular de glândulas salivares de camundongos (Nakamura et al., 2013). A remoção do gânglio submandibular parassimpático durante o período de embriogênese de glândulas submandibulares de camundongos levou à diminuição dos níveis de expressão de AQP3 (Knox et al., 2010).

2.4.3 Aquaporina 5 (AQP5)

Além da diminuição de AQP3 em glândulas onde a inervação foi inibida (Knox et al., 2010), a expressão de AQP5 em embriões de camundongos também é menor em glândulas irradiadas e que também possuem inervação parassimpática diminuída (Knox et al., 2013). A proteína AQP5 é expressa em diversos órgãos

como epitélio das vias aéreas, glândulas salivares e lacrimais (Ishikawa et al., 2006). Em seres humanos está localizada no cromossomo 12q13 (Lee et al., 1996).

Além de amplamente expressa e identificada no parênquima de glândulas salivares (Gresz et al., 2001; Nakamura et al., 2013), a AQP5 é uma proteína predominantemente expressa nas membranas apicais do epitélio glandular no qual atuam (Matsuzaki et al., 2012; Teymoortash et al., 2012). Liberada na saliva humana (Wang et al., 2009), AQP5 atua especificamente como principal via de regulação de permeabilidade da membrana plasmática acinar exercendo papel central na síntese de saliva (Krane et al., 2001; Delporte; Steinfield, 2006; Larsen et al., 2011) e está envolvida no balanço eletrolítico do fluido salivar secretado (Krane et al., 2001).

A regulação dos níveis de AQP5 em células acinares de glândulas submandibulares envolve a inervação autônoma (Hosoi, 2016) e sua expressão é variável dependendo das condições sistêmicas do indivíduo. Durante o período diurno, em que geralmente há maior produção de saliva, uma elevada expressão de AQP5 foi detectada, sendo que alterações nas taxas desta proteína de canal de água podem servir como indicador de diminuição ou aumento de saliva secretada (Wang et al., 2009). Da mesma maneira, a expressão de AQP5 nas glândulas submandibulares de ratos foi alterada dependendo do aumento ou diminuição do grau de luminosidade (Satou et al., 2019).

A análise de cultivo de organóides de glândulas salivares identificou índices de expressão de AQP5 reduzidas quando há diminuição do número de células mesenquimais ou eliminação dos fatores de crescimento *FGF2* mesenquimal (Hosseini et al., 2018). Além disso, algumas patologias como Síndrome de Sjögren e diabetes mellitus são caracterizadas também pela diminuição da expressão de AQP5, o que leva à redução do fluxo salivar (Wang et al., 2009). Para entender o mecanismo de transporte de AQP5 do citosol para a membrana plasmática, Tada e colaboradores (1999) identificaram que células de glândula salivar humanas transfectadas com genes AQP5 permitem a elevação de Ca^{2+}, o que induz a migração desta proteína à membrana plasmática celular.

A AQP5 expressa-se nas membranas luminais das células acinares de glândulas salivares totalmente desenvolvidas (Gresz et al., 2001; Matsuki et al., 2005), bem como majoritária expressão em membranas apicais acinares e de ducto intercalar nos distintos estágios de desenvolvimento humano (de Paula et al.,

2017b) sendo também descrita durante a embriogênese das glândulas submandibulares de camundongos (Larsen et al., 2011). Em ratos, AQP5 pôde ser observada em alguns sítios microvasculares durante o desenvolvimento glandular bem como nas membranas pro-acinares, sendo que sua expressão somente foi observada a partir do dia E18 por meio de imunoistoquimica (Akamaststu et al., 2003).

Ainda, Aure et al. (2011) sugerem que a AQP5 exerça função na embriogênese de glândulas salivares de camundongos, já que esta proteína auxilia no movimento de água entre membranas durante o desenvolvimento pre-natal. A expressão de AQP5 nos sítios ductais glandulares ainda não foi totalmente elucidada (Soyfoo et al., 2018), mas esta proteína é determinada como marcador positivo para células acinares e pro-acinares (Larsen et al., 2011; Hosseini et al., 2018).

Ainda, AQP5 pode exercer funções na fisiologia tumoral de mama, favorecendo seu desenvolvimento em seres humanos (Park et al., 2020), sendo identificada, assim como AQP3, como um possível marcador no prognóstico deste tipo tumoral (Zhu et al., 2018).

Apesar do canal de água AQP5 exercer papel central na secreção salivar (Krane et al., 2001), a inserção de adenovírus AQP1 nas glândulas salivares de modelo animal danificadas por irradiação resultou em aumento do fluxo de saliva secretada (Shan et al., 2005), o que poderia indicar participação importante desta AQP na salivação. Ainda, estudo realizado em glândulas salivares de camundongos em idade avançada demonstrou aumento na expressão de AQP1 em correlação com a diminuição de angiogênese, fisiologicamente comum nesta fase, sugerindo que esta proteína atue na tentativa de se manter o balanço de líquido intersticial realizando uma resposta compensatória (Sapmaz et al., 2016).

2.5 PROTEÍNAS VASCULARES, MIOEPITELIAIS E NERVOSAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES

2.5.1 Cluster of Differentiation-34 (CD34)

As células endoteliais fazem parte da vasculatura. Desta forma, a proteína “Cluster of Differentiation”-34 ou CD34 é observada na diferenciação endotelial, identificadas em capilares, vênulas, veias, arteríolas e artérias (Fina et al., 1990; Pusztaszeri et al., 2006). O anticorpo anti-CD34, comercialmente disponível serve para identificar proteínas vasculares e serão utilizados nesta pesquisa a fim de se observar o tecido que compõem tais estruturas nas glândulas salivares analisadas.

A molécula CD34 é uma glicoproteína transmembrânica identificada também na superfície de diversos tecidos e células, além do endotélio vascular e células progenitoras hematopoiéticas (Fina et al., 1990; Simmons et al., 1992; Paunovic et al., 2011). Além disso, CD34 exibe evidente expressão em células mesenquimais e estromais de glândulas salivares humanas fetais e adultas (Togarrati et al., 2017; Togarrati et al., 2018).

Células endoteliais expressando CD34 foram relacionadas a eventos de migração e angiogênese (Siemerink et al., 2012) sendo que, em células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais de diversos tecidos, esta glicoproteína pode ter papel funcional de moléculas de adesão (Fina et al., 1990). Mais recentemente, Togarrati et al. (2017) descreveram CD34 como molécula de adesão expressa nas células estromais e células progenitoras de glândulas salivares maiores humanas.

Glândulas submandibulares que exibem imunoexpressão de CD34 têm seu processo de ramificação, desenvolvimento e funcionamento relacionados ao desenvolvimento normal da arquitetura glandular. Sabe-se, ainda, que sua superexpressão é associada geneticamente a vias de sinalização de fatores de crescimento, proteínas de membrana basal e matriz extracelular (Togarrati et al., 2017).

Por meio de análise quantitativa, CD34 foi identificada de modo mais intenso em glândulas submandibulares humanas fetais (16-24 semanas) quando comparado ao mesmo tipo glandular adulto (Togarrati et al., 2017).

2.5.2 Actina de Músculo liso (AML)

Actina de Músculo Liso (AML) é a isoforma de actina comumente descrita como alfa Actina de Músculo Liso (α-AML), auxilia o processo de fibrogênese e é predominantemente expressa nas células de músculo liso vascular (Kawasaki et al., 2008). Especificamente, na microvasculatura AML é identificada em feixes de microfilamentos de pericitos em diversos órgãos tanto em humanos, quanto em modelos de roedores (Skalli et al., 1989). Pericitos são células contráteis de origem endodermal que enovelam a superfície das estruturas tubulares da vasculatura (Alarcon-Martinez et al., 2018; Zyrianova et al., 2019). As células mioepiteliais também expressam AML (Ogawa, 2003; Zyrianova et al., 2019); essa proteína ainda exerce importante função na contração de fibroblastos (Hinz et al., 2001).

Nas glândulas salivares, AML é expressa em células mioepiteliais de ácinos e ductos totalmente desenvolvidos (Togarrati et al., 2018). Durante o período de desenvolvimento glandular, além de identificada nas CMEs, AML pôde ser observada em estruturas vasculares permeando o tecido mesenquimal (Iañez et al., 2010). Partindo do 16º dia de desenvolvimento, a glândula salivar de camundongos expressa AML em seu epitélio basal glandular. Tais estruturas sofrem alterações morfológicas com o avanço da maturação parenquimal, assumindo características mais compactas e distendidas relativas às células mioepiteliais, uma vez que também esta se mantém em contato direto com a membrana basal do parênquima glandular (Nelson et al., 2013). Ainda, além de constituir vasos sanguíneos, tecidos contráteis de musculatura lisa também são identificados em vasos linfáticos (Petschnik et al., 2010).

Pacientes diagnosticados com Síndrome de Sjögren podem ter expressão de AML reduzida de maneira efetiva nas células mioepiteliais do parênquima glandular afetado pela doença, o que pode ocasionar a redução do fluxo salivar, um dos sintomas usuais da síndrome já que há perda de força mecânica desempenhada pelas CMEs na contração de células ductais e acinares (Sisto et al., 2018). Por fim, AML pode ser utilizada como marcador na classificação de tumores das glândulas salivares (Omitola OG; Iyogun, 2018).

2.5.3 S100

Identificadas pela primeira vez por Moore (1965), a família de proteínas S100 é composta por 27 membros (Garcia; Chazin, 2019) consideradas proteínas multifuncionais (Sedaghat; Notopoulos, 2008). Diferentes tipos celulares expressam diversas subunidades de S100 (Donato, 1999). Alguns membros desta família de proteínas auxiliam na proliferação celular e regulação de leucócitos via sinalização extracelular (Donato, 1999). Diversos tipos celulares que compõem estruturas de astrócitos, células ependimárias e tecidos oriundos da neuroectoderme expressam S100 (Molin et al., 1984), bem como células adiposas e células de Schwann do tecido nervoso periférico de glândulas salivares totalmente desenvolvidas (Nakazato et al., 1985) e células mioepiteliais de glândulas salivares humanas em desenvolvimento (Iañez et al., 2010).

Os nervos eferentes simpáticos e parassimpáticos chegam até as glândulas salivares por diferentes vias eferentes e, no momento em que se encontram no epitélio glandular, formam feixes do tipo Schwann-axônios, onde axônios dos distintos nervos autônomos se misturam associando-se às células de Schwann (Garrett; Kidd., 1993). As células de Schwann são estruturas nervosas que envolvem axônios de fibras neurais periféricas (Junqueira; Carneiro, 2008). Neste tipo celular, a expressão de S100 pode depender da extensão de mielina axonal (Mata et al., 1990).

Nas estruturas celulares, S100 se liga ao cálcio gerando respostas bioquímicas especializadas extra e intracelularmente (Marenholz et al., 2004) regulando a dinâmica conformacional das membranas, sua composição e a organização do citoesqueleto (Donato, 1999). A subunidade S100β, também é destacada por associação à estruturas filamentosas correspondentes a elementos de composição do citoesqueleto (Hara et al., 1983)

A partir da 12ª semana de desenvolvimento humano, o cérebro fetal expressa S100 em células e fibras nervosas de diferentes sítios do hipocampo (Chan et al., 2003). Nas glândulas salivares humanas S100 é identificado em estruturas de fibras nervosas ainda nos estágios incipientes do desenvolvimento (Iañez et al., 2010) e apesar de ter sido identificado somente no epitélio glândulas sublinguais de fetos em desenvolvimento por Katori et al. (2013), Iañez et al. (2010) observaram a expressão desta proteína em células mioepiteliais de diferentes tipos glandulares humanos nos estágios avançados de maturação (até 26 semanas). Em ratos, S100β não foi identificado durante o período inicial de embriogênese das glândulas salivares (Ogawa et al., 1999). Por outro lado, a glândula parótida humana desenvolvida exibe expressão de S100β nas células mioepiteliais que envolvem ductos intercalares e ácinos, além de nervos periféricos em diversos sítios do estroma glandular (Hara et al., 1983).

Níveis alterados de expressão de S100 podem estar associados à evolução tumoral (Marenholz et al., 2004), contribuindo com metástase, proliferação celular e outros processos cancerígenos (Bresnick et al., 2015).

2.5.4 Tuj-1

Tubb3 é o gene que codifica o isotipo de β tubulina III (Poirier et al., 2010). Normalmente identificada em tipos celulares oriundos da crista neural, a beta tubulina Classe III ou tubb3 (Mariani et al., 2015; Person et al., 2017) é detectada pelo anticorpo monoclonal Tuj-1 (Caccamo et al., 1989; Memberg; Hall, 1995; Nedvetsky et al., 2014; Acevedo et al., 2015), sendo este um dos anticorpos clássicos na identificação de inervação parassimpática, simpática, e nervos sensoriais (Bhattacharya et al., 2018).

A tubulina é um dos principais elementos de microtúbulos (Romaniello et al., 2015) que são filamentos de proteínas integrantes na formação estrutural do citoesqueleto celular, o qual está envolvido em uma infinidade de atividades citoplasmáticas como transporte, morfologia e proliferação das células (Person et al., 2017). Em seres humanos, mutações na proteína tubulina (especificamente TUBB3) podem alterar a dinâmica dos microtúbulos, que são essenciais também, à orientação axonal (Tischfield et al., 2010).

Em glândulas salivares, a inervação parassimpática é considerada crucial ao processo de organogênese, onde a expressão de proteínas neurais (tubb3), identificada por meio do anticorpo neural Tuj-1 esteve diminuída após irradiação, o que também ocasionou redução na expressão de AQP5 (Knox et al., 2013) e a remoção de gânglio parassimpático ocasionou diminuição de expressão da AQP3 (Knox et al., 2010) em GSM de embriões de camundongos.

2.6 SALIVA

Diariamente, ½ a 1 litro de saliva são secretados na cavidade oral. As glândulas salivares maiores são responsáveis por 85% do fluido salivar. Deste total, a glândula parótida secreta 25%, glândulas submandibulares 70% e glândulas sublinguais 5%. Já as glândulas salivares menores secretam cerca de 15% do total de saliva diária (Katchburian; Arana, 2017). O pH salivar varia de 6,8 a 7,2 (Ferraris; Munõz, 2006).

Essencial à homeostase oral, a saliva é um fluido aquoso responsável por desempenhar diversas funções (Roblegg et al., 2019). De modo geral, 99,5% do fluido salivar secretado é composto por água (Roblegg et al., 2019), mas uma série de substratos como a amilase, prolina, lactoferrina, IgA, lisozima e peroxidase, além de compostos como bicarbonato, cálcio e fosfato também compõem a saliva (Dodds et al., 2005). Além destes, fatores de crescimento celulares produzidos pelas glândulas salivares auxiliam na manutenção da homeostase (Saruta et al., 2020).

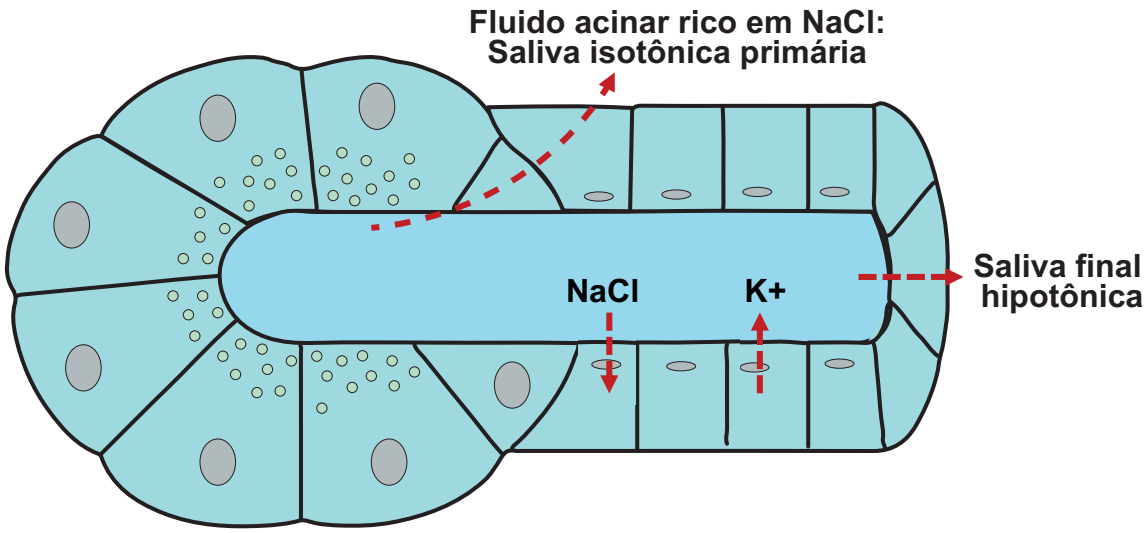
As membranas basolaterais e apicais das células acinares são integradas por um sistema de transporte iônico. O processo osmótico do qual a salivação precede é gerado por um gradiente transepitelial de íons auxiliando nos mecanismos de secreção (Ishikawa; Ishida, 2000). O equilíbrio e manutenção da saúde e bem-estar oral dependem não só do volume de saliva secretada, mas também de sua constituição proteica (Proctor; Carpenter, 2007). Além disso, o fluxo de saliva é necessário ao processo normal de mastigação, uma das principais funções exercidas pelas estruturas orofaciais (Saruta et al., 2020), agindo, ainda, como solução tampão na cavidade oral onde exerce ação antibacteriana, lubrificante, auxiliar no processo de digestão e paladar, contribuindo também na preservação e integridade da superfície dentária (Mandel, 1987; Moss, 1995; Dowd, 1999).

A formação da saliva ocorre em dois processos e é altamente dependente da capacidade dos ductos em adequarem a composição do fluido por meio de trocas iônicas. Inicialmente, a saliva é um ultrafiltrado do plasma sanguíneo, rico em NaCl, localizada ainda nas regiões de lúmen acinar onde é considerada um fluido isotônico

primário. Essa secreção passa posteriormente por diversas trocas iônicas, basicamente, NaCl são reabsorvidos e K+ é secretado durante sua passagem pelas estruturas ductais (Catalán et al., 2009; Roussa, 2011).

No processo de transporte de saliva até a cavidade oral, os primeiros ductos a receberem o fluido salivar primário são os ductos intercalares, que cumprem um papel passivo após sua secreção pelas células acinares (Ferraris; Munõz, 2006). Porções ductais das glândulas salivares são responsáveis pelas trocas eletrolíticas onde HCO_3^- e K^+ são secretados e Na^+ e Cl^- são absorvidos (Lee et al., 2012). A figura 2.7 ilustra o processo de transformação da saliva isotônica para hipotônica.

Figura 2.7 - Esquema ilustrando o processo de formação salivar



Fonte: Adaptado de Catalán et al. (2009).

A saliva isotônica primária é um fluido rico em NaCl quando secretada pelas células acinares para os ductos. Nas porções ductais, KHCO3 são secretados e NaCl é reabsorvido. Após alterações eletrolíticas, a saliva final é um fluido aquoso hipotônico.

Os estímulos para que essa secreção ocorra são regulados pelo sistema nervoso autônomo e o volume e constituição de saliva secretada dependerá do tipo de estímulo (Proctor; Carpenter, 2007). A disfunção das glândulas salivares pode estar associada à xerostomia, caracterizada pela sensação subjetiva de boca seca, ou mesmo à diminuição de saliva, o que compromete a qualidade de vida dos indivíduos afetados (Riley et al., 2017). A xerostomia pode afetar de modo importante a cavidade oral e os dentes levando a consequências como infecções fúngicas orais, periodontite, cáries, alterações de paladar, deglutição, ingestão e fala, impactando assim de forma significativa na qualidade de vida dos pacientes (Anttila et al., 1998; Ouanounou, 2016). Este quadro é comum em idosos

(Ouanounou, 2016) e em pacientes submetidos à radioterapia, sendo um dos efeitos colaterais deste tratamento para câncer de cabeça e pescoço (Strojan et al., 2017).

Ainda, alterações salivares ou xerostomia podem ser um dos sintomas importantes em consequência de doenças como Síndrome de Sjögren (Stefanski et al., 2017), diabete mellitus (Mauri-Obradors et al., 2017), doença celíaca (Gils et al., 2017), artrite reumatoide (Chamani et al., 2017), líquen plano oral (Larsen et al., 2017) entre outras, além de reação adversa a vários tipos de medicamentos (Cockburn et al., 2017). Nos últimos anos, quadros de xerostomia também foram associados à alterações hormonais decorrentes da menopausa (Yoshida et al., 2018). Com isso, a saliva pode ser considerada um fluido valioso com a utilização de biomarcadores que podem auxiliar no diagnóstico de diversas doenças (Sohail et al., 2020).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a correlação de expressão entre as aquaporinas 1, 3 e 5 e as células mioepiteliais, rede vascular e inervação durante o desenvolvimento das glândulas salivares maiores e menores humanas. Para isso, objetivamos responder aos questionamentos:

"**Qual a relação da presença das aquaporinas com o desenvolvimento da rede vascular, mioepitelial e da inervação durante o período inicial de formação das glândulas salivares humanas? A intensidade de expressão depende do estágio de maturação e/ou tipo de glândula salivar humana em desenvolvimento?"**

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Correlacionar a imunoexpressão das aquaporinas 1, 3 e 5 e o marcador de vasos sanguíneos CD34, analisando possíveis diferenças no padrão de expressão entre os diversos estágios do desenvolvimento (fase de botão à fase de botão terminal) e tipos glandulares glândulas parótidas (GP), glândulas submandibulares (GSM) e glândulas salivares menores (GM);

b) Correlacionar a imunoexpressão de aquaporinas 1, 3 e 5 com o marcador clássico de células mioepiteliais AML, além de S100, analisando possíveis diferenças no padrão de expressão entre os diversos estágios do desenvolvimento (fase de botão à fase de botão terminal) e tipos glandulares (GP, GSM e GM);

c) Correlacionar a imunoexpressão das aquaporinas 1, 3 e 5, do marcador de inervação S100 e anticorpo clássico da inervação autonômica TUJ1, analisando possíveis diferenças no padrão de expressão entre os diversos estágios do desenvolvimento (fase de botão à fase de botão terminal) e tipos glandulares (GP, GSM e GM).

Ainda, em projeto secundário realizado em parceria com a King's College London por meio de auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) 2017/2018, foi realizado o projeto de título: "O papel das aquaporinas durante a morfogênese da glândula salivar de camundongos: estudo funcional *in vitro".*

O objetivo do estudo desenvolvido no exterior foi analisar a função precoce das AQPs 1, 3 e 5 durante a formação glandular com o intuito de se responder ao seguinte questionamento:

"As aquaporinas são proteínas fundamentais para o desenvolvimento e funcionamento glandular?"

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Espécimes de glândulas salivares de fetos humanos oriundos de abortos espontâneos, obtidos do arquivo do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram utilizados neste estudo. Os espécimes foram identificados com até 24 semanas de vida intrauterina de acordo com a relação da medida plantar (McBride et al., 1984). Todos os fetos foram considerados como peças cirúrgicas por pesarem menos de 500 gramas e seu emprego nesta pesquisa foi aprovado por meio dos pareceres da Instituição proponente, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, CEP número 456.090 (anexo A) e CEP número 2.193.040 (anexo B), além de parecer elaborado pela instituição coparticipante Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, CEP número 2.201.792 (anexo C).

Foram realizados cortes seriados de 4µm de espécimes de glândulas parótidas, submandibulares e glândulas salivares menores previamente emblocados em parafina. Um total de 22 espécimes incluindo todas as fases da morfogênese glandular pertinentes à análise foram submetidos às técnicas de dupla marcação por meio de imunoistoquímica, corados por meio de DAB e fosfatase (IHC-P) e imunofluorescência (IHC-IF). O resumo dos espécimes glandulares e respectivas semanas do desenvolvimento analisadas estão descritos no quadro 4.1.

As subsequentes combinações das proteínas utilizadas para dupla marcação com as técnicas de imunoistoquímica e imunofluorescência estão descritas no quadro 4.2.

Quadro 4.1 - Resumo dos espécimes glandulares e respectivas semanas do desenvolvimento analisadas

Ensaios de dupla marcação para aquaporinas e proteínas vasculares, nervosas e contráteis	
Semanas de vida intrauterina	**Espécimes utilizados**
4 semanas (n=1)	Parótida
12 semanas (n=1)	Língua
13 semanas (n=2)	Parótida, mucosa jugal
14 semanas (n=1)	Assoalho
16 semanas (n=1)	Parótida
18 semanas (n=4)	Parótida, submandibular, assoalho, língua
19 semanas (n=1)	Submandibular
20 semanas (n=2)	Lábio, língua
21 semanas (n=3)	Parótida, submandibular, assoalho
22 semanas (n=2)	Parótida, lábio, língua
23 semanas (n=2)	Língua, assoalho
24 semanas (n=2)	Parótida, submandibular

Fonte: a autora.

Quadro 4.2 - Resumo das combinações de dupla marcação realizadas por meio das técnicas de imunoistoquímica (DAB + fosfatase) e imunofluorescência

Combinações de dupla marcação (IHC-P e IHC-IF)		
AQP1+CD34	AQP3+CD34	AQP5+CD34
AQP1+AML	AQP3+AML	AQP5+AML
AQP1+S100	AQP3+S100	AQP5+S100
AQP1+Tuj-1	AQP3+Tuj-1	AQP5+Tuj-1

Fonte: a autora.

4.1 DUPLA MARCAÇÃO EM IMUNOISTOQUÍMICA (IHC-P)

Cortes parafinados de 4µm de espécimes selecionados entre parótida, submandibular e glândulas salivares menores oriundas de diversas regiões da cavidade oral foram inicialmente desparafinados em três banhos de xilol; o primeiro

por 30 minutos à temperatura ambiente (TA), o segundo e terceiro banhos de 7 minutos cada também realizados à TA. A seguir os cortes foram reidratados em cadeia decrescente de etanol (100% e 95%) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos. Após lavagem em água corrente e água destilada, a recuperação dos epítopos antigênicos foi realizada de acordo com o soro primário utilizado, detalhada no quadro 4.3.

Após o período de recuperação e lavagem em água corrente e água destilada, foi realizada a incubação dos espécimes em 2 banhos de solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (mantidas no escuro) por 10 minutos cada, com o intuito de bloquear a peroxidase endógena tecidual, sendo posteriormente lavados com água corrente e água destilada. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito em leite Molico® a 10% diluído em solução tampão PBS pH 7,4 por 30 minutos em agitador. Banhos em água corrente e destilada foram novamente realizados. Em seguida, os cortes foram incubados com soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma®) diluídos em PBS pH 7,4 e mantidos em câmara úmida e escura overnight a 4°C. Os controles negativos foram realizados por meio de incubação de espécimes com soro não-imune. As informações acerca da diluição e da procedência dos anticorpos primários também estão descritas no quadro 4.3. Os procedimentos seguintes foram todos precedidos de duas lavagens em tampão Tris HCl pH 7,4.

Após período de incubação overnight, os espécimes foram incubados com o anticorpo secundário sistema Novolink™ (RE7260-K) em 2 etapas de 30 minutos cada. Para a reação de revelação, os espécimes são incubados com polímero do kit de revelação Ultravision e corados permanente pelo cromógeno diaminobenzidina – DAB Cell Marque (CAT 957D-30), que evidencia marcação do anticorpo de interesse por meio de coloração acastanhada. Os cortes são posteriormente lavados em água corrente e água destilada. O segundo anticorpo primário de interesse foi adicionado aos espécimes e mantidos, novamente, em câmara úmida e escura overnight a 4°C. Os procedimentos seguintes foram todos precedidos de duas lavagens em tampão Tris HCl pH 7,4. Após esse período, são novamente lavados em solução Tris HCl pH7,4.

No dia seguinte, realizou-se o processo de incubação com os polímeros secundários do sistema de fosfatase alcalina EnVision™ G/2 rabbit/mouse, permanente red (K5355) de acordo com o protocolo do fabricante (Dako Cytomation®), sendo revelados pela coloração fosfatase do mesmo kit, evidenciando marcação do segundo anticorpo primário de interesse por meio de coloração avermelhada. Os cortes foram posteriormente lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de *Carazzi* por aproximadamente 5 minutos. Subsequentemente, foram montados com lamínula em resina *permount*. Os controles negativos das reações supracitadas foram realizados por meio da incubação de espécimes com soro não-imune e os controles positivos pertinentes, incluídos de acordo com as especificações de cada anticorpo.

4.1.1 Análise de resultados obtidos por meio de imunoistoquímica (IHC-P)

Os resultados foram analisados em microscópio óptico de luz de acordo com o padrão de marcação tecidual e registrados com equipamento fotográfico digital (Olympus BX41).

4.2 DUPLA MARCAÇÃO EM IMUNOFLUORESCÊNCIA (IHC-IF)

Cortes parafinados de 4µm de espécimes selecionados entre parótida, submandibular e glândulas salivares menores oriundas de diversas regiões da cavidade oral foram inicialmente desparafinados em três banhos de xilol; o primeiro por 30 minutos à temperatura ambiente (TA), o segundo e terceiro banhos de 7 minutos cada também realizados à TA. A seguir os cortes foram reidratados em cadeia decrescente de etanol (100% e 95%) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos. Após

lavagem em água corrente e água destilada, a recuperação dos epítopos antigênicos foi realizada de acordo com o soro primário utilizado (quadro 4.3).

Após o período de recuperação e lavagem em água corrente e água destilada, foi realizada a incubação dos espécimes em 2 banhos de solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (mantidas no escuro) por 10 minutos cada, com o intuito de bloquear a peroxidase endógena tecidual, sendo posteriormente lavados com água corrente e água destilada. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi feito com leite Molico® a 10% diluído em solução tampão PBS pH 7,4 por 30 minutos em agitador. Banhos em água corrente e destilada foram novamente realizados. Em seguida, os cortes foram incubados com soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma®) diluídos em PBS pH 7,4 e mantidos em câmara úmida e escura overnight a 4°C. Os controles negativos foram realizados por meio de incubação de espécimes com soro não-imune. As informações acerca da diluição e da procedência dos anticorpos primários também estão descritas no quadro 4.3.

Após a incubação de anticorpo primário em período overnight, a remoção dos anticorpos foi feita por 6 lavagens em PBS Triton 0,5% de 30'cada. Uma vez ligados aos anticorpos primários, anticorpos secundários Alexa Fluor® (Invitrogen™) são aplicados ao espécime correspondente. A diluição do fluoróforo foi realizada em em solução de bloqueio por 3-4 horas em TA. Para os casos onde a dupla marcação foi incubada com anticorpos diferentes (rabbit/mouse), após esse período, repetiu-se a lavagem com PBS Triton 0,5% e as amostras foram montadas com lamínulas de vidro em meio de montagem Fluoroshield® (Abcam™).

Já nos casos onde os marcadores de interesse são produzidos em mesmo animal (rabbit/rabbit ou mouse/mouse), após a revelação do primeiro anticorpo primário e posterior revelação com Alexa Fluor®, 6 lavangens PBS Triton 0,5% por 30 minutos cada foram realizadas e o segundo anticorpo primário foi incubado e mantido em câmara úmida e escura overnight a 4°C. No dia seguinte, novamente após 6 lavangens PBS Triton 0,5% por 30 minutos cada, o respectivo fluoróforo Alexa Fluor®, diluído em solução de bloqueio foi mantido em câmara úmida e escura a temperatura ambiente por 3 a 4 horas. Após esse período, repetiu-se 6 lavagens de 30 minutos cada com PBS Triton 0,5% e as amostras foram montadas com lamínulas de vidro em meio de montagem Fluoroshield® (Abcam™).

4.2.1 Análise de resultados obtidos por meio de imunofluorescência (IHC-IF)

A análise proteica dos espécimes submetidos à imunofluorescência foi realizada em microscópio de fluorescência Zeizz® Axiophot MC 80 DX onde foram considerados os padrões arquiteturais de marcação fluorescente e, posteriormente os resultados foram digitalmente capturados *in silico*.

Quadro 4.3 - Dados dos anticorpos primários utilizados no estudo em glândulas salivares humanas com respectivos fornecedores, código, clone, procedência, titulação e recuperação antigênica aplicados

Anticorpo primário	Fornecedor/ código	Clone/ Procedência	Controle positivo	Titulação	Recuperação antigênica
AQP1	abcam ab9566	Mouse Monoclonal	Rim	1:500	Citrato pH 6,0 Steamer
AQP3	abcam ab153694	Rabbit Policlonal	Rim	1:400	Citrato pH 6,0 Steamer
AQP5	abcam ab92320	Rabbit Monoclonal	Pulmão/ Cólon	1:400	Citrato pH 6,0 Steamer
CD34	Dako M7165	Mouse Monoclonal	Placenta/ Tonsila	1:50	EDTA pH 9,0 Steamer
Actina de Músculo Liso (AML)	Abcam ab5694	Rabbit Policlonal	Mama/ Rim	1:100	Citrato pH 6,0 Steamer
S100	Dako Z0311	Rabbit Policlonal	Tonsila	1:100	Citrato pH 6,0 Steamer
Tuj-1	R&D Systems MAB1195	Mouse Monoclonal	Cérebro	1:150	Citrato pH 6,0 Steamer

Fonte: a autora.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS PROGRAMA DOUTORADO SANDUÍCHE NO EXTERIOR (PDSE)

4.3.1 Obtenção dos espécimes

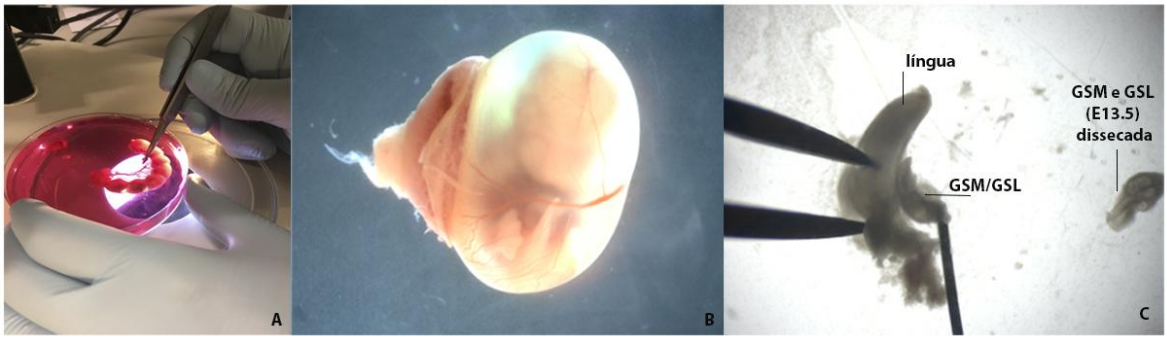
Os experimentos realizados em glândulas salivares de embriões de camundongos foram desenvolvidos por meio de auxílio do Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE) - CAPES, em colaboração com o Departamento de Desenvolvimento Craniofacial e Biologia de Células-Tronco da King's College London (Londres, Reino Unido), realizados de acordo com a aprovação do comitê de ética local e diretriz ARRIVE (animal research: reporting of *in vivo* experiments), alojados em condições aprovadas e livres de patógenos não específicos. Os camundongos albinos da linhagem CD1 foram mantidos na Unidade de Serviços Biológicos (BSU) da Instituição, sendo assistidos e gerenciados pela equipe técnica.

Espécimes de glândulas salivares de embriões de camundongos CD1 entre os dias embrionários 13.5 (E13.5) e E16.5, foram dissecadas de maneira a se obter glândulas submandibulares e sublinguais, se possível, preservando a mesma cápsula mesenquimal. A partir de E12.5, a anatomia da GSM e glândula sublingual (GSL) pode ser evidenciada em embriões com auxílio de estereoscópio invertido Leica®. Na figura 4.1, podemos observar o modelo de dissecção de glândulas salivares submandibular e sublingual em estágio E13.5. Nessa fase, as estruturas epiteliais rudimentares são envolvidas por densa cápsula mesenquimal e estão localizadas entre a cartilagem de Meckel e a base da língua, o que facilita sua identificação e remoção.

Para evitar qualquer tipo de degeneração celular, durante todo o processo de dissecção foi utilizado o meio de cultura Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 (DMEM F12) (Invitrogen®) com adição de 1% GlutamaxTm (Invitrogen®) e 1% de penicilina-estreptomicina, proporcionando um meio nutritivo que permite o cultivo de glândulas salivares sem a necessidade de suplementação sorológica.

A figura 4.1 ilustra o processo de dissecção das GSMs e GSLs de embriões de camundongos CD1.

Figura 4.1 - Figura ilustrando o processo de dissecção das GSMs e GSLs de embriões de camundongos CD1



Fonte: a autora.

Embriões de camundongo CD1, manipulados em meio DMEM e visualizados em estereoscópio invertido Leica® (A); embrião de camundongo CD1 em E13.5 ainda dentro da placenta (B), dissecção das GSL e GSM guiados pela posição anatômica da língua (C).

4.3.2 Cultura de Tecido

Os espécimes obtidos através da dissecção de embriões de camundongos CD1 foram submetidos ao cultivo sobre membranas permeáveis (Falcon Cell Culture inserts, BD Biosciences®), (poros de 0,4µm) sobrenadantes ao meio DMEM F12 e incubados a 37°C e 5% CO2. Registros fotográficos foram realizados a cada 24h também em estereoscópio invertido Leica®.

4.3.3 Processamento dos espécimes - Imunofluorescência em *whole mount*

Amostras das glândulas salivares de diferentes embriões foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA, Alfa Aesar®) em PBS por 30 minutos à temperatura

ambiente. Após a remoção do PFA, 3 lavagens de 10 minutos cada foram realizadas com PBS.

Em seguida, para a realização da técnica de imunofluorescência em *whole mount*, os espécimes frescos foram permeabilizados com 0,1% Triton em PBS (PBSTr) à temperatura ambiente e deixados em solução bloqueadora por 2h a 4°C (10% soro fetal bovino e 1% BSA em PBSTr) para o bloqueio de proteínas inespecíficas. O anticorpo primário foi adicionado a solução bloqueadora por 3 noites a 4°C (quadro 4.4). O excesso foi removido com lavagens em PBS (seis lavagens de 30 minutos em PBSTr), incubadas em anticorpo secundário (1:500 Alexa Fluor, Invitrogen®) e em DAPI (1:1000, Invitrogen®) na mesma solução bloqueadora por 2 noites a 4°C. Removeu-se os anticorpos com seis lavagens de 30 minutos em PBSTr, duas de PBS e finalmente o tecido foi montado em lâminas com meio de montagem Fluoroshield (Abcam®). Os resultados foram obtidos e registrados por meio da visualização dos espécimes em microscópio confocal de escaneamento a laser (TCS SP5, Leica®) e fotografados no mesmo aparelho.

Isto posto, os resultados obtidos a partir do projeto principal, isto é, oriundos desta tese de doutorado, serão descritos primeiro; seguidos dos resultados obtidos a partir da análise do projeto secundário (PDSE).

Quadro 4.4 - Dados dos anticorpos primários utilizados no estudo em glândulas salivares de camundongos CD1 e respectivos fornecedores, marca, código, clone, procedência, titulação, período de incubação e temperatura

Anticorpo primário	**Marca/ código**	**Clone/ Procedência**	**Titulação**	**Controle positivo**	**Período de incubação e temperatura**
AQP1	Abcam Ab9566	Mouse Monoclonal	1:300	Rim	2 overnight em geladeira (2°- 8 °C) agitando
AQP3	Santa Cruz SC-518001	Mouse Monoclonal	1:200	Rim	2 overnight em geladeira (2°- 8 °C) agitando
AQP5	Sigma-Aldrich 178615	Rabbit Policlonal	1:200	Pulmão/Cólon	2 overnight em geladeira (2°- 8 °C) agitando
Phospho-Histone3 (PH3)	Cell Signaling #9701	Rabbit Policlonal	1:500	Tonsila	2 overnight em geladeira (2°- 8 °C) agitando
Actina de músculo liso (AML)	Abcam ab5694	Rabbit Policlonal	1:200	Mama	2 overnightsem geladeira (2°- 8 °C) agitando
CD-31	Abcam ab28364	Rabbit Policlonal	1:50	Tonsila	2 overnight em geladeira (2°- 8 °C) agitando

Fonte: a autora.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO E CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES HUMANAS EM DESENVOLVIMENTO - PANORAMA GERAL

Os estágios do desenvolvimento das glândulas salivares de camundongos descritos por Jasckoll e Melnick (1999) e resumidos por Tucker (2007) foram citados anteriormente de forma minuciosa destacando as fases pré-botão, botão inicial, pseudoglandular, canalicular e botão terminal. Tais nomenclaturas identificam o processo de maturação estrutural das glândulas salivares e vem sendo amplamente utilizada por pesquisadores em artigos científicos e livros relacionados ao assunto sendo correlacionados, também, a espécimes glandulares humanos.

Por meio das diversas pesquisas acerca do desenvolvimento glandular humano realizadas por este grupo ao longo dos anos, pôde-se concluir que as glândulas salivares se desenvolvem de maneira heterogênea possibilitando a identificação das diversas fases do desenvolvimento em um mesmo espécime, independentemente de seu período de maturação em semanas.

Por meio desta pesquisa, no entanto, foi consistente que a análise de espécimes em estágios mais incipientes de maturação da glândula parótida (4 a 18 semanas), exibiu predomínio dos estágios de botão inicial e pseudoglandular. Nesses tipos glandulares, estágios canaliculares e de botão terminal foram predominantemente identificados somente por volta da 19ª semana de desenvolvimento, até último período de maturação incluído neste estudo (24 semanas).

Por outro lado, apesar de também possuir heterogeneidade fenotípica acerca dos estágios do desenvolvimento glandular independente das semanas de maturação, glândulas submandibulares exibiram características morfológicas mais desenvolvidas quando comparadas às glândulas parótidas na mesma semana de desenvolvimento. As fases de botão inicial e pseudoglandular estiveram

predominantes até a 16ª semana de maturação, onde, após esse período, os estágios mais avançados canalicular e botão terminal foram identificados mais frequentemente, indicando que a GSM, apesar de iniciar seu desenvolvimento após a GP, se desenvolva de modo mais acelerado.

Já as glândulas salivares menores exibem os estágios canalicular e principalmente botão terminal de forma majoritária desde o período mais inicial de maturação analisados (12 semanas em glândulas salivares menores), sugerindo que, apesar de iniciarem seu desenvolvimento mais tardiamente as GMs se desenvolvam de modo muito mais ágil quando comparadas às glândulas salivares maiores.

5.2 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE REDE VASCULAR E AQPS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES

5.2.1 Colocalização de proteínas vasculares (CD34) e AQPs 1, 3 e 5 na glândula parótida (IHC-P e IHC-IF)

As GPs bem como GSMs e GMs humanas em desenvolvimento exibiram expressão de estruturas vasculares por meio dos marcadores CD34, Actina de Músculo Liso (AML) e, em alguns sítios/espécimes, AQP1 e S100. Dentre as proteínas citadas, no entanto, CD34 é reconhecida como proteína clássica de expressão em vasos sanguíneos. Sendo assim, CD34 será classificada no âmbito de análise específica da vasculatura nesta pesquisa.

Houve expressão de CD34 nos vasos sanguíneos em formação da GP em todas as fases do desenvolvimento e períodos de maturação em semanas analisadas (4 - 24 semanas). Em muitos casos, foi possível observar a comunicação acinar inicial e ductal com o tecido vascular expresso por meio de CD34, muitas

vezes circundando ou mesmo justapostos às membranas do parênquima glandular em formação (figuras 5.1A e I, seta).

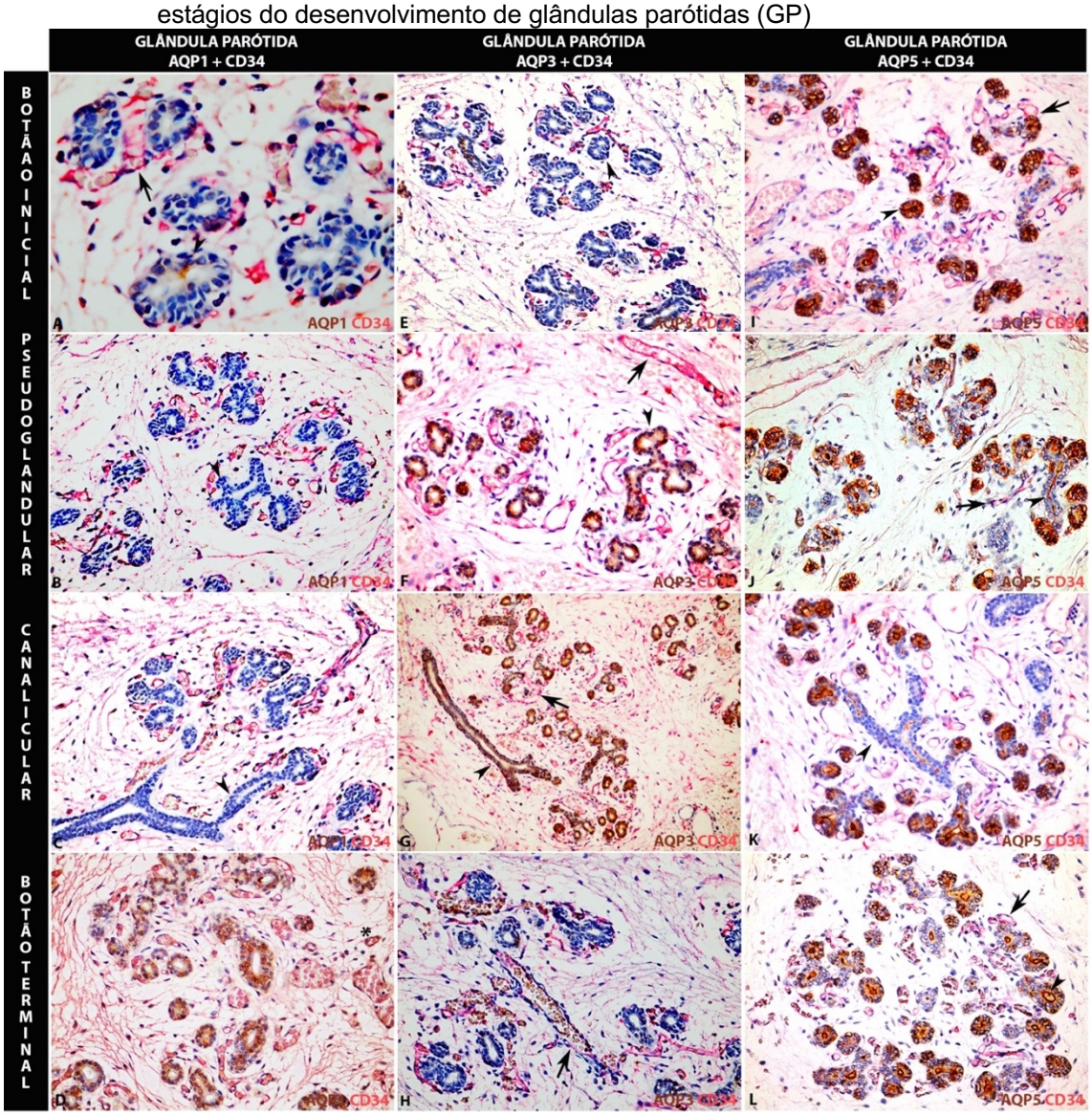
Em alguns espécimes foi possível observar vasos de maior calibre difundindo-se ao mesênquima parotídeo, irrigando vasos sanguíneo e capilares que se comunicam com o epitélio glandular em formação (figura 5.1H seta).

A proteína AQP1 foi fracamente expressa em estruturas acinares pouco desenvolvidas de GP com 4 semanas de desenvolvimento (figura 5.1A, ponta de seta), tornando-se mais evidente de maneira difusa em células acinares na 22ª semana de maturação deste tipo glandular (figura 5.1D), além de identificada em alguns sítios vasculares, onde houve colocalização com CD34 (figura 5.1D, asterisco).

A expressão de AQP3, por sua vez, foi observada em células basais nas estruturas ductais de espécimes no período mais incipiente de desenvolvimento analisado (4 semanas) (figura 5.1E). Nos estágios mais avançados do desenvolvimento como em espécime de 21 semanas, foi possível identificar expressão de AQP3 de maneira difusa em botões acinares iniciais e estágio pseudoglandular (figuras 5.1F e G ponta de seta). Não houve colocalização entre AQP3 e CD34 em parênquima ou mesênquima glandular analisados.

Estruturas de botões acinares exibiram intensa expressão de AQP5, inicialmente de maneira difusa (figura 5.1I, ponta de seta), posteriormente de modo mais intenso nas membranas apicais pro-acinares e ductais intercalares nos diversos estágios onde essas estruturas puderam ser observadas (figuras 5.1J-L, ponta de seta). A proteína AQP5, previamente relatada em estruturas vasculares (Akamatsu et al., 2003), não pôde ser identificada no mesmo sítio em espécimes glandulares humanos, não havendo colocalização entre AQP5 e CD34.

Figura 5.1 - Exemplos dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e CD34 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP)



Fonte: a autora.

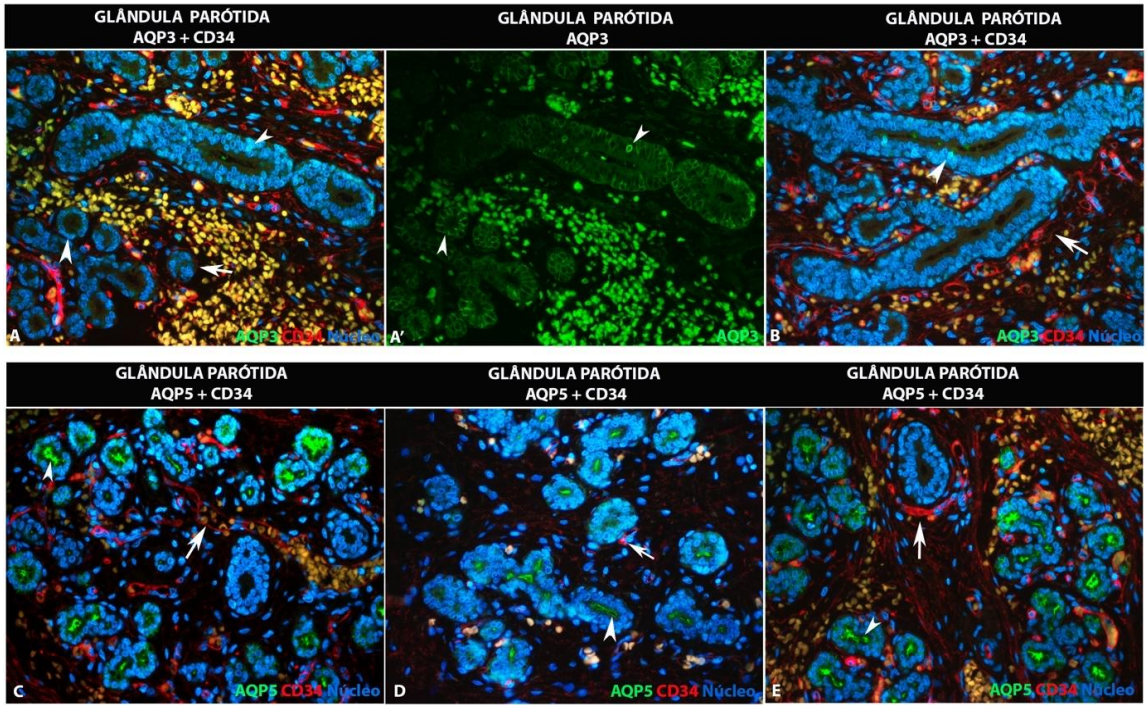
Estágio de botão inicial evidenciando expressão de AQP1 na coloração acastanhada (ponta de seta) e vasculatura expressa por meio de CD34 na coloração vermelha (seta), espécime de 4 semanas, aumento 100x **(A**); estágio pseudoglandular exibindo rara evidência de expressão para AQP1 (ponta de seta) e CD34 expresso em vasos sanguíneos enovelando parênquima glandular, espécime de 4 semanas, 40x **(B)**; estágio canalicular evidenciando abertura de lúmen ductal (ponta de seta) e vasossanguíneos (vermelho), espécime de 4 semanas, 40x **(C)**; representação de botão terminal em glândula parótida com 22 semanas, evidenciando colocalização entre AQP1 e CD34 em estrutura de microvasculatura (asterisco), expressão acinar difusa para AQP1 (castanho) e para CD34 em microvasculatura isolada (vermelho), 40x **(D)**; estágio botão inicial (ponta de seta), espécime de 4 semanas, 40x **(E)**; estágio pseudoglandular expressando AQP3 de modo difuso (ponta de seta), vasos sanguíneos (seta) e capilares exibindo positividade para CD34, 21 semanas, 40x **(F)**; estágio canalicular exibindo AQP3 células basais de ducto (ponta de seta) e de modo difuso em estruturas acinares, além de microvasculatura representando vasos enovelando parênquima (vermelho), 21 semanas, 20x **(G)**; representação de botão terminal em glândula parótida com 4 semanas, evidenciando positividade em vaso calibroso por meio de CD34 (seta) além de capilares, 4 semanas, 40x **(H)**; estágio botão inicial com expressão difusa e intensa de AQP5 em formações pré-acinares (ponta de seta) e positividade em vasos sanguíneos que também se comunicam com ácinos (seta), 21 semanas, 40x **(I)**; estágio pseudoglandular expressando AQP5 em membranas apicais de ducto intralobular rudimentar (seta), estruturas acinares assumindo padrão de expressão mais confinado nas regiões de membrana apical e expressão de CD34 em finas formações teciduais vasculares

(seta), 13 semanas, 40x **(J)**, estágio canalicular expressando AQP5 em abertura luminal de ductos (ponta de seta) e ácinos, microvasculatura positiva (vermelho), 13 semanas 40x **(K)**; representação de botão terminal em glândula parótida evidenciando expressão de AQP5 de modo mais intenso nas membranas apicais acinares (ponta de seta) e CD34 positivo comunicando-se com ácino (seta) e em microvasculatura, espécime de 21 semanas 40x **(L)**.

Por meio de dupla marcação em imunofluorescência, a GP em espécimes de 24 semanas gestacionais exibiu extensa rede vascular enovelando todo o parênquima parotídeo em formação (figura 5.2). Membranas basolaterais de células ductais estriadas expressam AQP3, bem como membranas basolaterais acinares (figuras 5.2A, A', B, ponta de seta), irrigadas por microcirculação representada por CD34 (figuras 5.2A e B, setas).

A expressão apical de AQP5 é evidenciada por meio de fluorescência em todos os estágios analisados, onde também a microvasculatura é identificada por meio de CD34, muitas vezes comunicando-se com estruturas acinares e ductais, mas não colocalizando-se com as AQPs 3 ou 5 (figuras 5.2C,D,E), o que corrobora nossos resultados em imunoistoquímica evidenciados por meio de DAB e fosfatase.

Figura 5.2 - Exemplos dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e CD34 em GP



Fonte: a autora.

(**A, A', B, ponta de seta**) AQP3 expressa em membranas basolaterais acinares e ductais (**A e B, seta**), expressão de CD34 em vasculatura circundando o parênquima glandular com 24 semanas, aumento 40x; (**C, D, E ponta de seta**) expressão de AQP5 confinada em membranas apicais acinares (**C, E ponta de seta**) e ductais (**D, ponta de seta**) e expressão de CD34 em estruturas vasculares (**C, D, E, seta**), 24 semanas de desenvolvimento, aumento 40x.

5.2.2 Colocalização de proteínas vasculares (CD34) e AQPs 1, 3 e 5 na glândula submandibular (IHC-P e IHC-IF)

Conforme citado anteriormente, a GSM exibe um padrão de evolução da arquitetura tecidual melhor desenvolvido que a GP quando avaliados na mesma semana de maturação, onde foi possível identificar maior proporção dos estágios pseudoglandular, canalicular e de botão terminal.

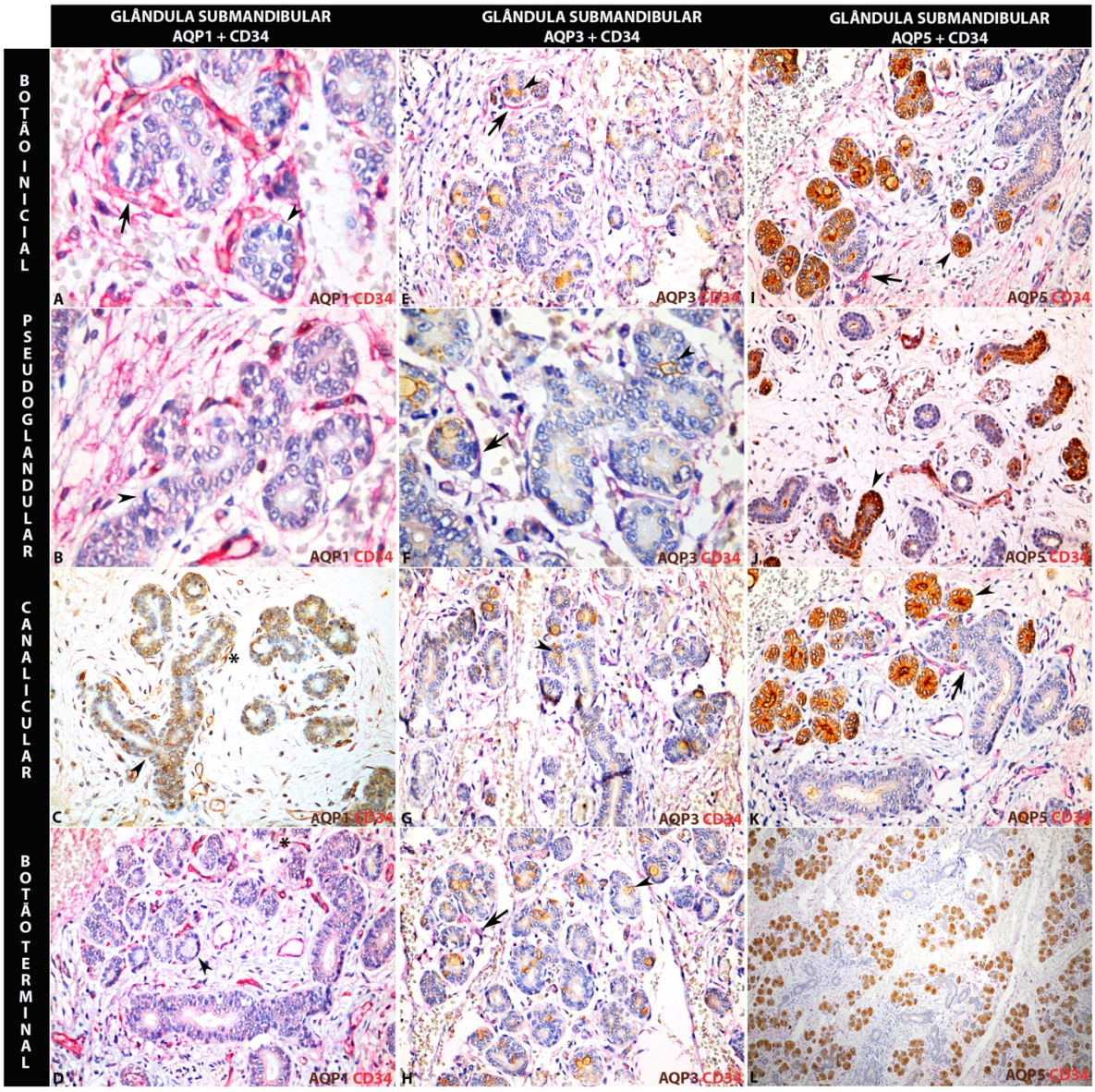
Quanto às estruturas de vasos sanguíneos, a GSM exibe um padrão de vascularização muito similar à GP, também evidenciado por meio de CD34, sendo identificado em todas as fases do desenvolvimento e períodos de maturação em semanas analisados.

Na GSM a expressão de AQP1 foi evidenciada de modo pouco intenso em células basais aleatoriamente distribuídas no parênquima glandular com 19 semanas de formação (figura 5.3C, ponta de seta), ausente nos estágios de botão inicial, pseudoglandular e botão terminal com 24 semanas de desenvolvimento (figuras 5.3A, B e D) e positiva em vasos sanguíneos da microcirculação (figura 5.3C). Foi possível observar colocalização entre os marcadores CD34 e AQP1 em diversos sítios vasculares no mesênquima glandular (figura 5.3C, asterisco)

As células acinares mistas mucosas e serosas, exibiram um padrão de expressão mais organizado para AQP3, além de frequentemente mais intenso nas membranas basolaterais de células que parecem ser maiores ou melhor desenvolvidas, exibindo ainda expressão citoplasmática difusa e menos intensa em GSMs com 24 semanas de desenvolvimento (figura 5.3H). Não houve colocalização entre AQP3 e CD34.

Já AQP5 exibe o mesmo padrão de expressão entre as glândulas maiores parótida e submandibular, observado de maneira difusa em ácinos menos desenvolvidos com intensidade evidente nas membranas apicais onde é possível observá-la, tornando-se mais evidentemente confinado nas membranas luminais pro-acinares conforme o avanço do desenvolvimento. Não houve colocalização entre AQP5 e CD34.

Figura 5.3 - Exemplos dos resultados dos ensaios de colocalização AQPs 1, 3 e 5 e CD34 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM)



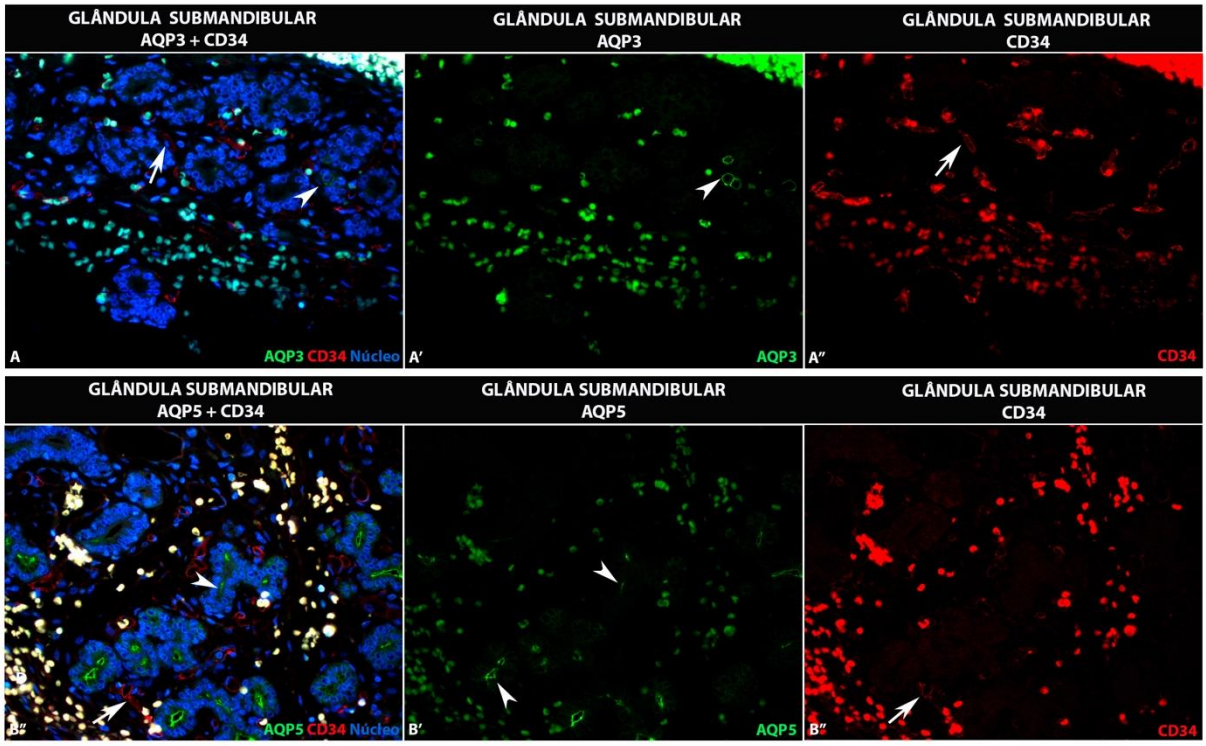
Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial (ponta de seta) e expressão de CD34 evidenciando vasculatura circundando botões iniciais (seta), espécime de 24 semanas, 100x (**A**); estágio pseudoglandular (ponta de seta) e CD34 positivo em vasos sanguíneos, espécime de 24 semanas, 100x (**B**); estágio canalicular expressando AQP1 em vasos sanguíneos, células basais de estruturas ductais (ponta de seta) e acinares, co-expressando AQP1 e CD34 em raros vasos sanguíneos (asterisco), espécime de 19 semanas, 40x (**C**); estágio botão terminal (ponta de seta), expressão de CD34 em estruturas microvasculares (vermelho), colocalização entre AQP1 e CD34 em sítios microvasculares (asterisco), espécime de 24 semanas, 40x (**D**); estágio botão inicial evidenciando expressão citoplasmática de AQP3 em células acinares isoladas (ponta de seta), expressão de CD34 em vasos sanguíneos (seta), espécime de 24 semanas, 40x (**E**); estágio pseudoglandular evidenciando expressão de AQP3 em membranas basolaterais de células pro-acinares isoladas (ponta de seta), expressão de CD34 em vasos sanguíneos comunicando-se com botões acinares, espécime de 24 semanas, 100x (**F**), estágio canalicular evidenciando expressão citoplasmática de AQP3, confinada majoritariamente em membranas basolaterais de células isoladas (ponta de seta), expressão vascular de CD34 (vermelho), 21 semanas, 40x (**G**); expressão de AQP3 em membranas basolaterais e citoplasma de botões terminais (ponta de seta), expressão de CD34 em vasos sanguíneos circundando parênquima (seta), espécime de 24 semanas, 40x (**H**); estágio botão inicial com expressão de AQP5 predominantemente em membranas apicais além de citoplasma (ponta de

seta), expressão de CD34 em vasos sanguíneos (seta) espécime de 24 semanas 40x (**I**); estágio pseudoglandular expressando AQP5 em formações pré-ductais e acinares assumindo padrão de expressão mais confinado nas regiões de membrana apical (ponta de seta) e expressão de CD34 em finas formações teciduais vasculares (seta), 40x (**J**), estágio canalicular expressando AQP5 majoritariamente em membranas apicais acinares (ponta de seta), CD34 positivo em vasos sanguíneos (seta), espécime de 24 semanas, 40x (**K**); representação de botão terminal em glândula submandibular com 24 semanas, 10x (**L**).

Por meio de imunofluorescência, a expressão de AQP3 nas membranas basolaterais de células pro-acinares específicas (figuras 5.4A e A', ponta de seta), de AQP5 em porções pro-acinares apicais (figura 5.4B', ponta de seta) e em formações rudimentares de lúmen ductal (figura 5.4B, ponta de seta), bem como de uma rede vascular bem estabelecida identificadas por meio de CD34 puderam ser evidenciadas (figuras 5.4A,A",B,B", seta).

Figura 5.4 - Exemplos dos resultados dos ensaios de colocalização por imunofluorescência das AQPs 3 e 5 e CD34 em GSM



Fonte: a autora.

(**A** e **A' ponta de seta**) expressão de AQP3 em membranas basolaterais acinares, (**A** e **A'', seta**) expressão de CD34 em vasos sanguíneos e capilares enovelando parênquima glandular com 21 semanas, aumento 40x; (**B e B' ponta de seta**) expressão de AQP5 confinada em membranas apicais ductais (fig **5.4B**) e acinares (fig 5.4**B'**); (**B** e **B'', ponta de seta**) expressão de CD34 em estruturas vasculares enovelando parênquima glandular com 24 semanas de desenvolvimento, 40x.

5.2.3 Colocalização de proteínas vasculares (CD34) e AQPs 1, 3 e 5 nas glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF)

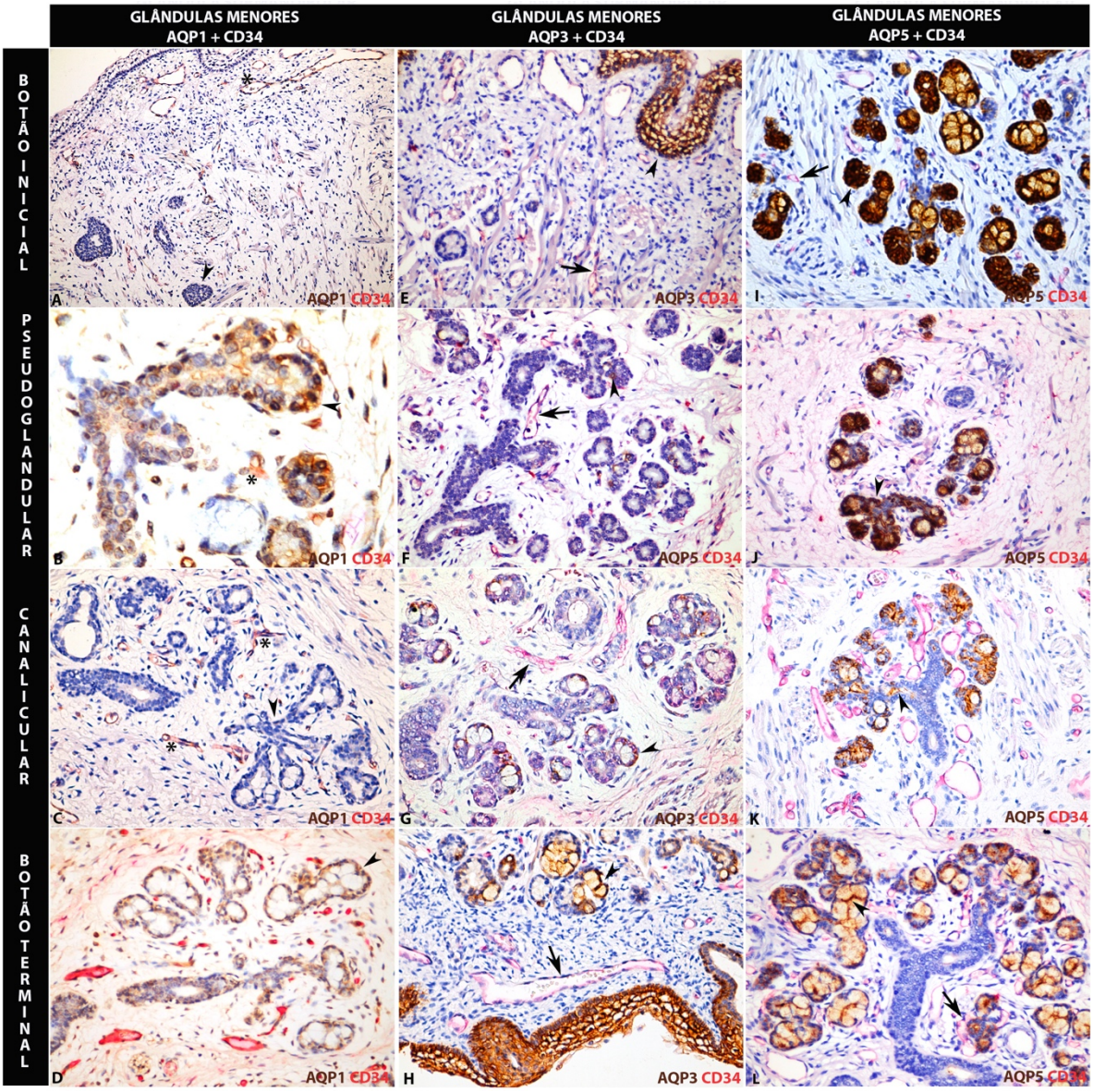
Apesar de descrita na literatura como o último tipo glandular a iniciar seu desenvolvimento (a partir do 3º mês), glândulas salivares menores analisadas com 12 semanas evidenciaram ácinos mucosos desenvolvidos a nível canalicular e botão terminal em grande parte dos espécimes analisados. Assim como nas GP e GSM, GMs exibiram positividade para CD34 em todas as fases do desenvolvimento e períodos de maturação em semanas analisados. No entanto, dentre os diferentes espécimes oriundos do interior da cavidade oral onde foram identificadas glândulas salivares menores, algumas regiões como palato parecem exibir um padrão de expressão vascular menos difuso. Por outro lado, espécimes de língua, por exemplo, evidenciaram uma rede vascular mais profusa por meio de CD34 (figuras 5.5H e L, seta).

O padrão de expressão de AQP1 nas GMs permaneceu semelhante ao exibido em GP e GSM. No entanto, GSMs e GMs podem exibir expressão de AQP1 em membranas basais de células acinares e ductais (figura 5.5B, ponta de seta). Em alguns casos, AQP1 foi observada em possíveis células mioepiteliais de estruturas acinares melhor desenvolvidas (figura 5.5D, ponta de seta). Apesar de CD34 apresentar expressão proeminente nas estruturas vasculares difundida no estroma das glândulas menores, em alguns casos, foi possível se observar coexpressão entre AQP1 e CD34 em vasos sanguíneos (figuras 5.5A e C, asterisco).

Em diferentes espécimes e regiões da cavidade oral, foi possível identificar intensa expressão de AQP3 nas regiões em que resquícios da mucosa em assoalho bucal (figura 5.5E, ponta de seta) e mucosa lingual (figura 5.5H) podem ser identificados. Não houve colocalização entre AQP3 e CD34 nas glândulas salivares menores.

O padrão de expressão de AQP5 em glândulas salivares menores ocorreu de maneira um pouco distinta das glândulas maiores. Não há colocalização de expressão entre AQP5 e CD34 nas GMs.

Figura 5.5 - Exemplos dos resultados de colocalização entre AQPs 1, 3 e 5 e CD34 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas salivares menores (GM)



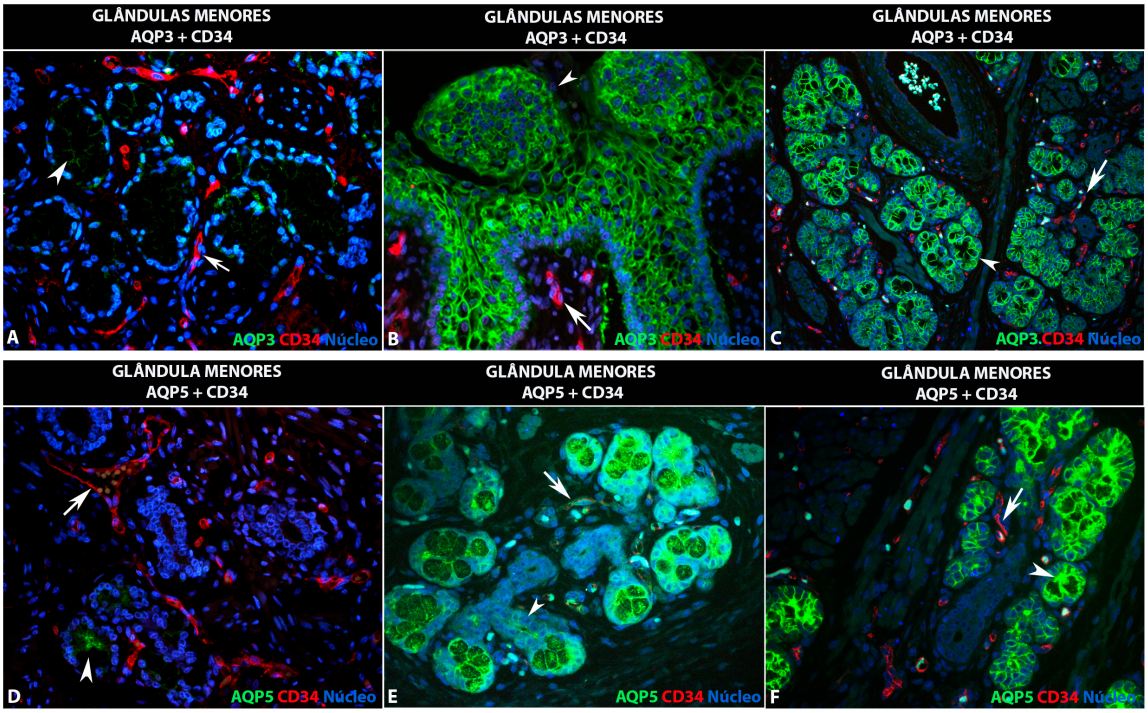
Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial (ponta de seta), colocalização entre AQP1 e CD34 em vasos sanguíneos (asterisco), espécime de língua, 40x (**A**); estágio pseudoglandular evidenciando expressão difusa de AQP1 (ponta de seta) e colocalização entre AQP1 e CD34 em vasos sanguíneos, espécime língua, 23 semanas, 100x (**B**); estágio canalicular (ponta de seta) e colocalização entre AQP1 e CD34 em diversos sítios vasculares (asteriscos), espécime lábio, 22 semanas, 40x (**C**); estágio botão terminal com expressão basal de AQP1 (ponta de seta), raros capilares e CD34 exibindo expressão intensa na microvasculatura, espécime lábio, 22 semanas, 40x (**D**); estágio botão inicial (ponta de seta), expressão de AQP3 nos queratinócitos de epitélio de assoalho bucal (ponta de seta) e expressão de CD34 na microvasculatura (seta), 21 semanas, 40x (**E**); estágio pseudoglandular, 23 semanas, assoalho, 40x (F), estágio canalicular expressando AQP3 em membranas acinares basolaterais (ponta de seta) e CD34 expresso em vasos sanguíneos (seta), espécime de mucosa jugal, 13 semanas, 40x (**G**); estágio botão terminal evidenciando expressão citoplasmática e de membranas basolaterais para AQP3 (ponta de seta) além de queratinócitos de mucosa língua, CD34 exibindo expressão em vasos sanguíneos (seta), espécime língua, 23 semanas, 40x (**H**); estágio botão inicial exibindo expressão intensa e difusa de AQP5 em formações pré-acinares (ponta de seta), CD34 expressa em vasos sanguíneos, espécime língua, 23 semanas, 40x (**I**); estágio pseudoglandular expressando AQP5 em formações pré-ductais e acinares (ponta de seta), espécime de 18 semanas, 40x (**J**), estágio canalicular expressando AQP5 de maneira difusa no citoplasma acinar e de modo

mais intenso, nas membranas apicais, bem como em lúmen intercalar (ponta de seta) e CD34 expresso em vasos sanguíneos, espécime assoalho, 23 semanas, 40x (**K**); estágio botão terminal expressando AQP5 em citoplasma e membranas apicais acinares (castanho), vaso enovelando estruturas acinares identificados em vermelho por meio de CD34 (seta), espécime língua, 23 semanas, 40x (**L**).

A figura 5.6 ilustra a expressão de membranas basolaterais de AQP3 em ácinos mucosos (figuras 5.6A e C ponta de seta) e queratinócitos de mucosa lingual e papilas gustativas (figura 5.6B), enovelada pela microvasculatura que se comunica com o parênquima glandular expressa por meio de CD34 (figuras 5.6A-C, seta), enquanto AQP5 exibiu intensa expressão em membranas apicais acinares (figuras 5.6D e F, ponta de seta), além de expressão luminal em ductos intercalares (figuras 5.6 ponta de seta) e expressão de CD34 em vasos sanguíneos (D-F, seta).

Figura 5.6 - Exemplos dos ensaios de imunofluorescência evidenciando dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e CD34 em GM



Fonte: a autora.

Expressão de AQP3 em membranas basolaterais acinares **(A,** ponta de seta) e queratinócitos de mucosa lingual e papilas gustativas (**B,** ponta de seta) além de CD34 expresso em vasos sanguíneos (setas) em espécimes de língua, 12 semanas, 40x **(A,B)**; AQP3 expressa em membranas basolaterais acinares (ponta de seta) e CD34 em vasos sanguíneos de assoalho, 40x **(C)**; expressão de AQP5 confinada em membranas apicais acinares (ponta de seta) e expressão de CD34 em estruturas vasculares (seta), língua, 12 semanas, 40x **(D)**; expressão citoplasmática e majoritariamente apical acinar e ductal de AQP5 (ponta de seta) e expressão de CD34 em estruturas vasculares (seta), assoalho, 21 semanas, 40x **(E)**; expressão de AQP5 em membranas basais e apicais acinares (ponta de seta) e expressão de CD34 em estruturas vasculares (seta), assoalho, 40x **(F)**.

5.3 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE CÉLULAS MIOEPITELIAIS E AQPS EM GLANDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES

5.3.1 Ensaios de colocalização das proteínas AML e AQPs 1, 3 e 5 na glândula parótida (IHC-P e IHC-IF)

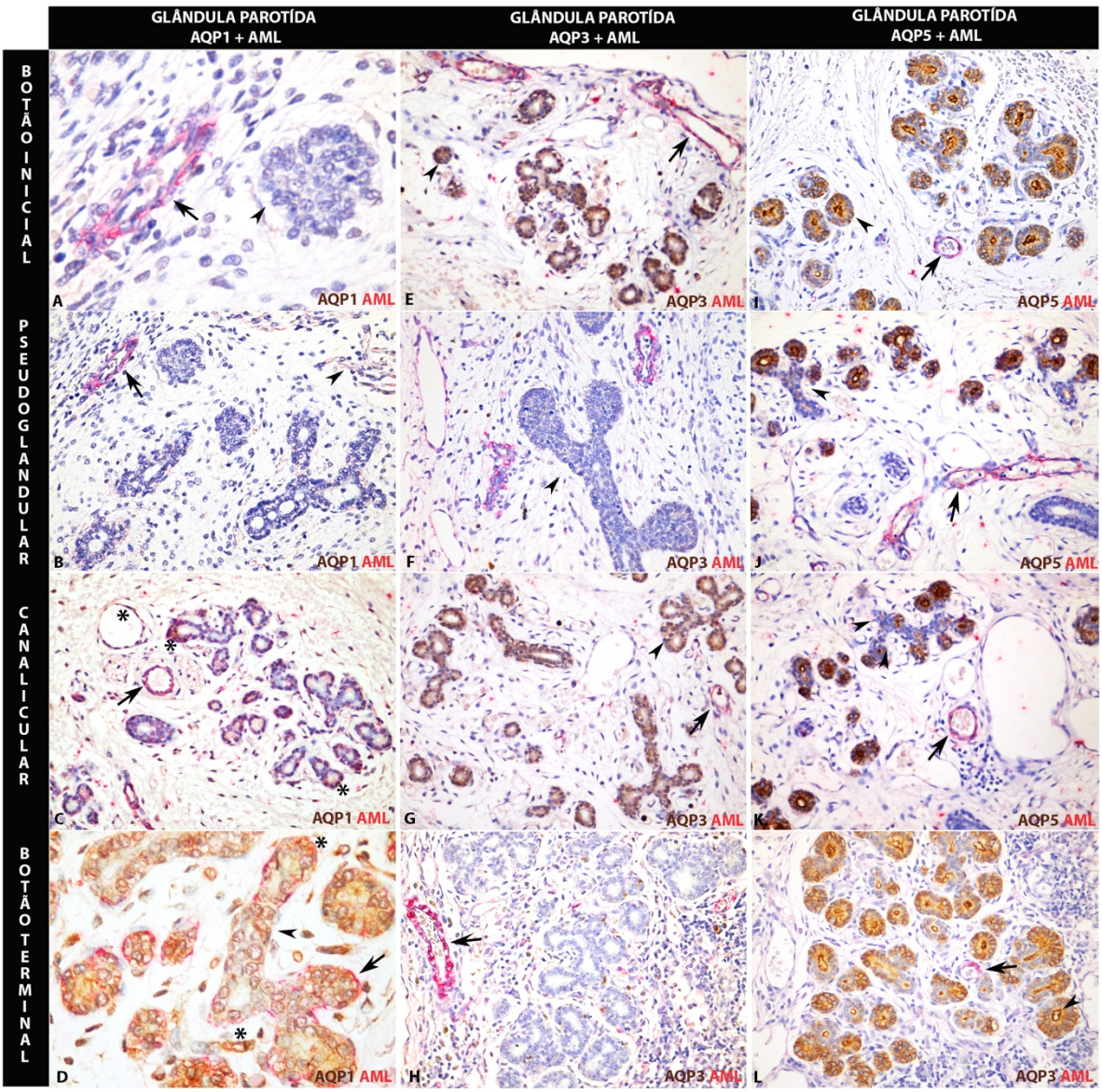
A expressão de AML foi evidenciada em vasos sanguíneos de maior calibre e arteríolas em todas as fases do desenvolvimento e períodos de maturação glandular em semanas estudados, além de expressa células mioepiteliais em estruturas onde foi possível identificá-las.

A expressão de AQP1 não pôde ser evidenciada em diversas estruturas pro-acinares de GP de 4 semanas (figuras 5.7A, ponta de seta), sendo somente expressa em estruturas microvasculares de modo pouco intenso (figura 5.7B, ponta de seta) durante o período mais incipiente do desenvolvimento. Estruturas acinares terminais de 24 semanas, no entanto, exibiram expressão difusa de AQP1 na GP (figura 5.7D). Houve colocalização entre AQP1 e AML em células mioepiteliais (figura 5.7C, asterisco) e vasculares (figura 5.7D, asterisco).

AQP3 exibiu expressão difusa em botões acinares (figura 5.7E, ponta de seta) e canaliculares (figura 5.7G, ponta de seta) em espécimes com 21 semanas, sendo ausente sua expressão, no entanto, em estágio pseudoglandular de GP com 4 semanas de desenvolvimento (figura 5.7F, ponta de seta). Não houve colocalização entre AQP3 e AML.

AQP5 exibiu padrão de expressão similar ao descrito anteriormente para GP, confinada de modo mais intenso nas membranas acinares apicais em todos os estágios do desenvolvimento. Não houve colocalização entre AQP5 e AML.

Figura 5.7 - Exemplos dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e AML nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP)



Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial (ponta de seta) expressando CD34 em vaso sanguíneo (seta), 4 semanas, 100x **(A)**; estágio pseudoglandular, AQP1 expressa em capilares (ponta de seta) e AML expressa em vaso sanguíneo (seta), 4 semanas, 40x **(B)**; estágio canalicular evidenciando possível colocalização entre AQP1 e AML em células mioepiteliais (asteriscos), AML expresso na vasculatura de GP com 24 semanas, 40x **(C)**; estágio botão terminal com expressão difusa de AQP1 (ponta de seta) e AML expressa células mioepiteliais (seta), colocalizando AQP1 e AML em vasos sanguíneos (asterisco), 24 semanas, 100x **(D)**; estágio botão inicial expressando AQP3 de modo difuso (ponta de seta) e AML expressa em vasos sanguíneos, 21 semanas, 40x **(E)**; estágio pseudoglandular (ponta de seta), 4 semanas, 100x **(F)**, estágio canalicular expressando AQP3 difusamente (ponta de seta) expressão de AML em vasos sanguíneos (seta), 21 semanas, 40x **(G)**; estágio botão terminal (ponta de seta) expressando AML em vaso sanguíneo (seta), 18 semanas, 40x **(H)**; estágio botão inicial exibindo expressão citoplasmática e apical (ponta de seta), AML expresso em vasos sanguíneos, 40x **(I)**, estágio pseudoglandular exibindo expressão acinar citoplasmática difusa e apical para AQP5 (ponta de seta) e AML em vasos sanguíneos (seta), 40x **(J)**, estágio canalicular exibindo expressão de AQP5 em citoplasma e membranas apicais de ácinos e membrana luminal de ducto intercalar (ponta de seta), AML expressa em vasos sanguíneos (seta), 21 semanas, 40x **(K)**; espécime de 18 semanas, 40x (ponta de seta) **(L)**.

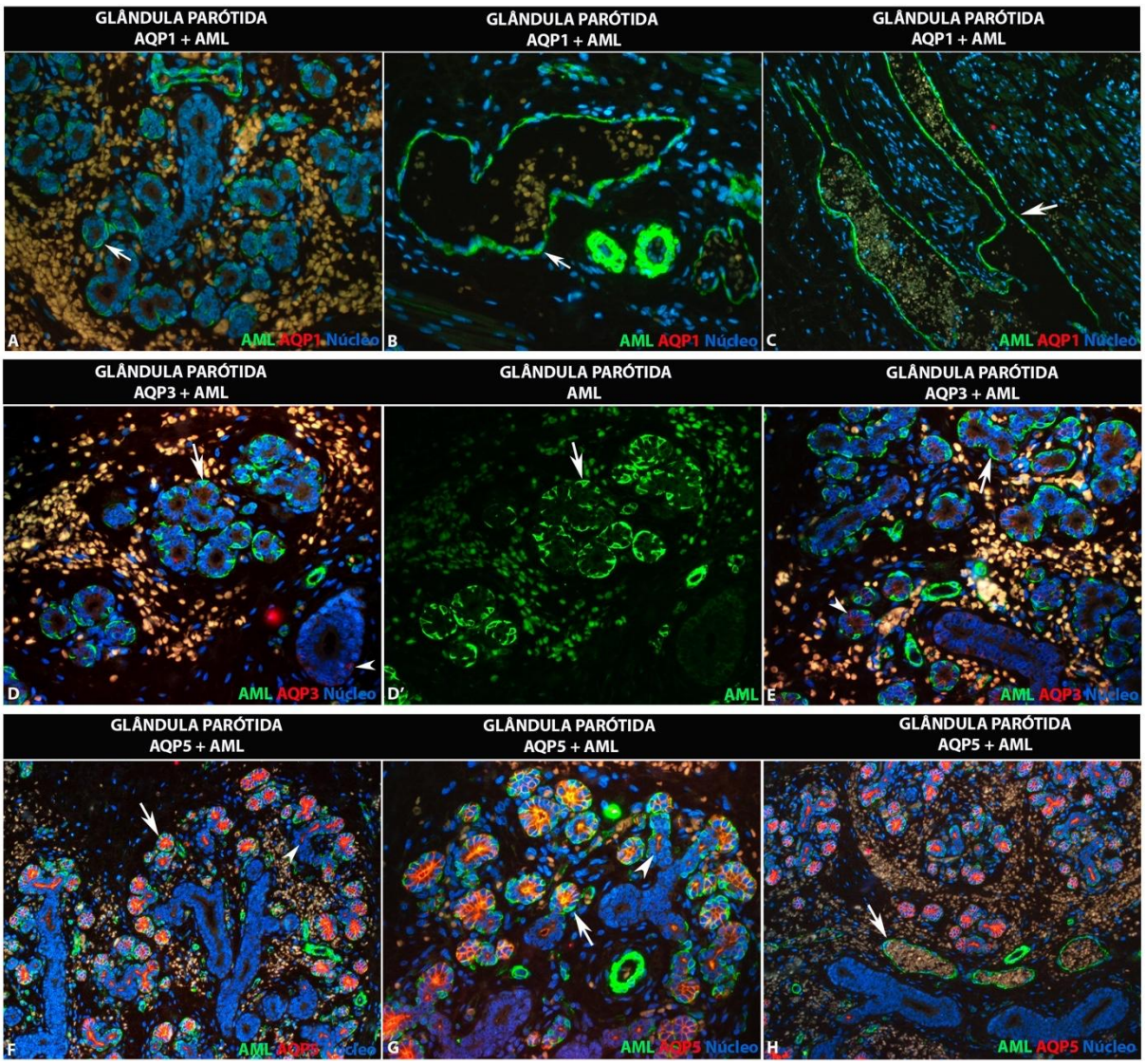
Por meio da técnica de imunofluorescência, células mioepiteliais ao redor dos ácinos serosos foram identificadas por meio de AML (figura 5.8A, seta) bem como em vasos sanguíneos evidenciadas de forma intensa em GP de 24 semanas (figuras 5.8B e C, setas)

Quando em dupla marcação com AML, AQP1 não pôde ser identificada por meio de imunofluorescência nas glândulas parótidas (figuras 5.8A-C).

Ainda, por meio de imunofluorescência, AQP3 foi observada nas membranas basolaterais de ductos estriados (figura 5.8D, ponta de seta) e membranas basolaterais de células acinares (figura 5.8E, ponta de seta) e AML foi identificada em células mioepiteliais acinares (figuras 5.8D-E setas e vasos sanguíneos). Não houve colocalização entre AQP3 e AML também por meio da técnica de imunofluorescência.

A expressão de AQP5 foi expressa de modo intenso e evidente no lúmen acinar (F, ponta de seta) e ductal intercalar (G, ponta de seta). Em diversas estruturas luminais, podemos observar a coloração alaranjada onde a expressão luminal para AQP5 é contrastada com AML, sugerindo, assim, que por meio da técnica de IHC-IF, seja possível evidenciar a colocalização de expressão entre tais proteínas, uma vez que as células mioepiteliais abraçariam o parênquima glandular, alcançando o lúmen acinar e ductal intercalar, mesmo sítio de expressão de AQP5.

Figura 5.8 - Exemplos dos ensaios de imunofluorescência evidenciando dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e AML em GP



Fonte: a autora.

Ausência da expressão de AQP1 por meio de IHC-IF e AML exibindo evidente expressão em células mioepiteliais acinares (**A**, seta) e vasculatura glandular parotídea (**B** e **C**), espécimes 24 semanas, 40x; expressão de AQP3 em membranas basolaterais de células acinares e de ducto estriado (**D** ponta de seta) e células mioepiteliais abraçando ácinos serosos expressas por meio de AML (**D'**, seta), 24 semanas, 40x; expressão de AQP1 em membranas basolaterais acinares (**E**, ponta de seta) e AML expressa em células mioepiteliais que abraçam ductos (**E**, seta), 40x; expressão de AQP5 confinada em membranas apicais de ductos intercalares (**F** e **G**, ponta de seta) e membranas apicais acinares, expressão de AML em células mioepiteliais acinares (**F** e **G**, seta) e vasculatura (**H**, seta), espécimes 24 semanas, (F, 20x; G, 40x; H, 20x).

5.3.2 Ensaios de colocalização das proteínas AML e AQPs 1, 3 e 5 na glândula submandibular (IHC-P e IHC-IF)

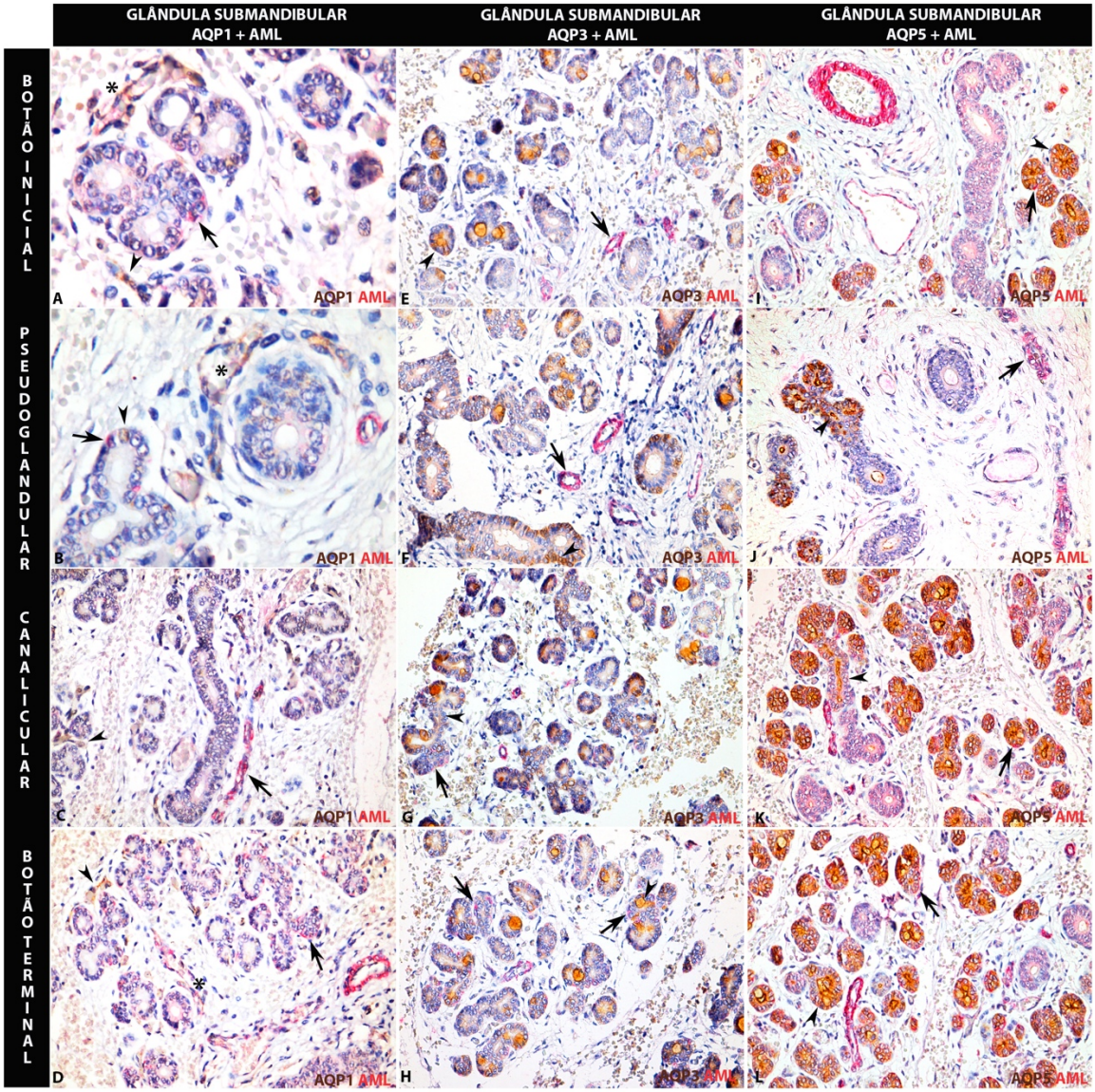
Nas GSMs a expressão de AML pôde ser identificada diversos sítios vasculares de maior calibre e arteríolas em todas as fases do desenvolvimento e estágios de maturação em semanas analisados, além de expressão evidente em células mioepiteliais de GSMs com 24 semanas de maturação em todas as fases do desenvolvimento (entre botão inicial e botão terminal) incluindo estruturas de botão inicial e pseudoglandular (figuras 5.9A e B seta) e diversas estruturas vasculares (figuras 5.9C, E, F e J, seta).

Além da intensa expressão em microvasculatura (figuras 5.9A, C, D, ponta de seta), APQ1 se expressou de maneira pouco intensa em estruturas acinares de alguns espécimes em todas as fases deste tipo glandular durante a 24ª semana de desenvolvimento (figura 5.9B). Além disso, houve colocalização entre AQP1 e AML em diversos sítios microvasculares (figuras 5.9A, B e D, asterisco).

No mesmo período de desenvolvimento (24ª semana), AQP3 foi expressa de modo intenso nas membranas basolaterais e citoplasma de células que parecem ser maiores e, portanto, mais desenvolvidas, compondo estruturas acinares dos diversos estágios do desenvolvimento, além de membranas basolaterais de células basais em ductos estriados (figuras 5.9F, ponta de seta). Não houve colocalização entre AQP3 e AML neste tipo glandular.

Ainda, AQP5 permanece fortemente expressa em todas as fases do desenvolvimento da GSM, evidente de maneira difusa e em citoplasma de diversos ácinos, sendo expressa, porém, confinada de modo mais intenso nos sítios apicais de aberturas luminais pré-ductais (figuras 5.9J, K, ponta de seta) e acinares (figuras 5.9I, L, ponta de seta). Não houve colocalização entre AQP5 AML na GSM.

Figura 5.9 - Exemplos dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e AML nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM)



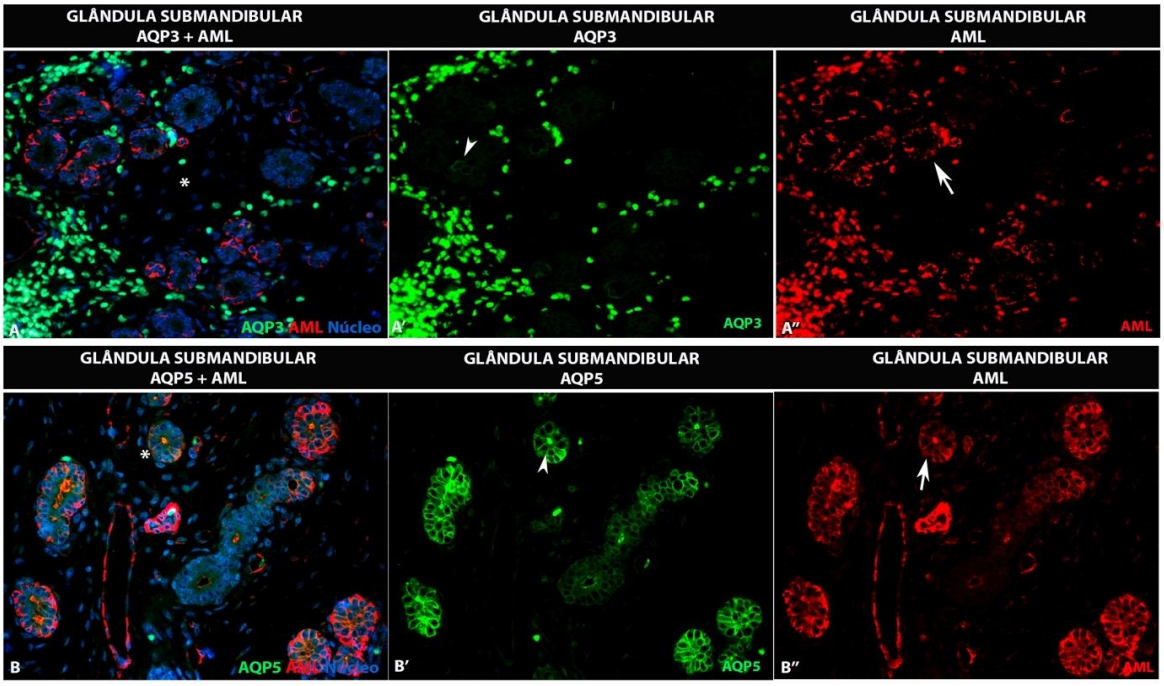
Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial, AQP1 expressa na microvasculatura (ponta de seta), células mioepiteliais expressas por meio de AML (seta), colocalização entre AQP1 e AML em estrutura vascular (asterisco), 24 semanas aumento 100x **(A)**; estágio pseudoglandular evidenciando expressão basal rara em célula acinar (ponta de seta), AML expressa em célula mioepitelial (seta) e vasculatura, além de colocalização entre AQP1 e AML em sítios de vasos sanguíneos (asterisco), 24 semanas, 100x **(B)**, estágio canalicular, AQP1 exibindo expressão em capilaner circundando botões acinares (ponta de seta), vaso de maior calibre acompanhando porção ductal estriada, expresso por meio AML (seta), 24 semanas, 40x **(C)**; estágio de botão terminal, expressão de AQP1 em vasos sanguíneos e capilares (ponta de seta), células mioepiteliais (seta) e arteríolas expressas por meio de AML, colocalização de AQP1 e AML em estruturas microvasculares (asterisco), 24 semanas, 40x **(D)**; AQP3 em estágio de botão inicial com expressão difusa de AQP3 (cabeça de seta) e AML em células mioepiteliais (seta), 24 semanas, 40x **(E)**; expressão difusa de AQP3 em estágio pseudoglandular, evidenciando intensidade em membranas basolaterais também em células basais de ducto estriado (cabeça de seta) e AML expressa de maneira intensa em arteríolas (seta) e vasos sanguíneos, 24 semanas, 40x **(F)**; estágio canalicular com expressão citoplasmática de AQP3 evidenciando maior intensidade em membranas basolaterais de diversas células acinares (cabeça de seta) e AML expressa em células mioepiteliais do parênquima glandular (seta) e vasos sanguíneos, 24 semanas, 40x **(G)**; expressão de AQP3 em membranas basolaterais e citoplasma de diversas células acinares em estágio de botão terminal (cabeça de seta) e AML em células mioepiteliais (setas) e vasos

sanguíneos, 24 semanas, 40x **(H)**, expressão difusa de AQP5 e em estruturas acinares em estágio de botão inicial, evidenciando maior intensidade em membranas apicais (cabeça de seta), expressão de AML em células mioepiteliais (seta), vasos sanguíneos e arteríolas, 24 semanas, 40x **(I)**; estágio pseudoglandular com expressão luminal em início de abertura de ducto intralobular (cabeça de seta) e acinar, expressão de AML em estruturas vasculares (seta), 19 semanas, 40x (J); estágio canalicular expressando AQP5 em lúmen ductal (cabeça de seta) e células acinares, expressão de AML em células mioepiteliais (seta) e estruturas vasculares, 24 semanas, 40x **(K)**; estágio de botão terminal exibindo expressão basal e apical de AQP5, bem como citoplasma de diversas células acinares (cabeça de seta), expressão de AML em células mioepiteliais acinares (seta) e tecido vascular, 24 semanas, 40x **(L)**.

Por meio de IHC-IF, GSMs com 21 semanas de desenvolvimento exibiram expressão de AQP3 em membranas basolaterais de algumas células pré-acinares (figura 5.10A', ponta de seta); expressão apical e, em alguns casos, basal para AQP5 também foi verificada em GSM com 19 semanas de vida intrauterina (figuras 5.10B e B', ponta de seta). Em ambos os casos houve expressão de AML nas células mioepiteliais (A'' e B'', setas), e em vasos sanguíneos de maior calibre. Ainda, ocorreu sobreposição de expressão entre AQP5 e AML nas regiões de abertura luminal (figura 5.10B, asterisco). A sobreposição entre AQP5 e AML somente ocorreu em estruturas acinares e pré-ductais, vasos sanguíneos somente expressaram AML não havendo colocalização com AQP5 (figuras 5.10 B-B'').

Figura 5.10 - Exemplo dos ensaios de imunofluorescência de dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e AML em GSM



Fonte: autora.

Expressão de AQP3 em membranas basolaterais acinares **(A, A',** ponta de seta)e células mioepiteliais (**A, A''**,seta), 21 semanas, 40x; sobreposição de expressão entre AQP5 **(B, B')** e AML **(B, B'')** em membranas apicais de estruturas pré-ductais e membranas basais e apicais acinares, na microvasculatura, somente AML é expressa **(B, B'')**, 19 semanas, 40x.

5.3.3 Ensaios de colocalização das proteínas AML e AQPs 1, 3 e 5 nas glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF)

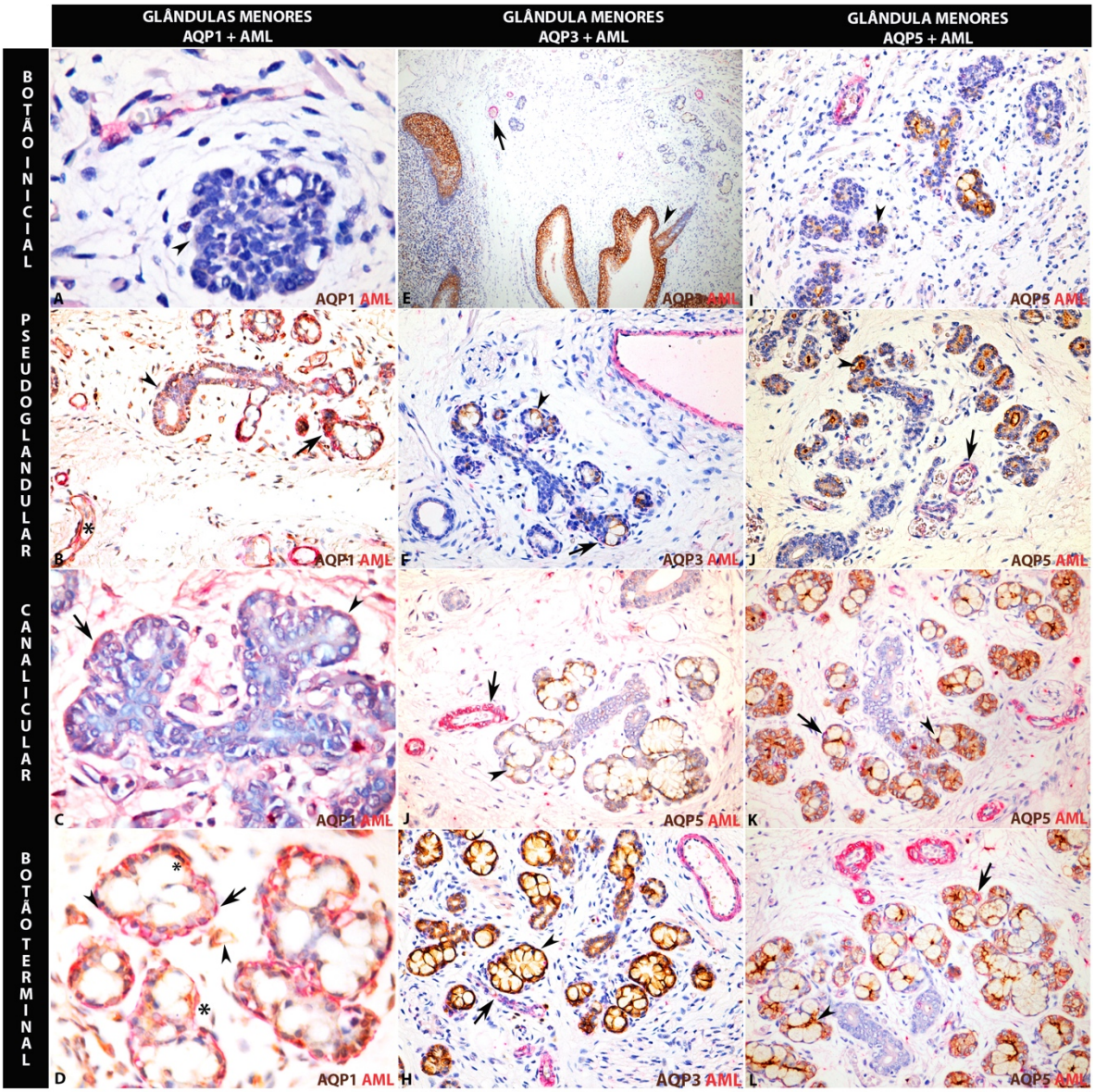
As glândulas salivares menores humanas mostraram morfologia acinar bem desenvolvida no período mais incipiente da gestação, como anteriormente descrito. Nessas glândulas não houve expressão de AML nas células mioepiteliais nos estágios de botão inicial, (figuras 5.11A e I). Já nos estágios mais avançados do desenvolvimento, AML foi identificada no mioepitélio glandular (figuras 5.11B,C,D,F,K e L, setas). Diferentemente das células mioepiteliais, diversas estruturas vasculares mesenquimais exibiram expressão para AML em todos os estágios do desenvolvimento e período de maturação em semanas.

A análise dos resultados nos permitiu evidenciar a expressão de AQP1 de modo difuso em membranas basais de diversas células do parênquima glandular e ductal (figura 5.11C estágio canalicular), além de sua expressão na microvasculatura e células mioepiteliais (figura 5.11D). Houve colocalização entre AQP1 e AML em vasos sanguíneos (figura 5.11C, asterisco), e células mioepiteliais (figura 5.11D, asterisco).

AQP3 exibiu expressão difusa no citoplasma de estruturas acinares bem desenvolvidas, com proeminente marcação nas membranas basolaterais deste tipo celular (figuras 5.11F e H). Não houve colocalização entre AQP3 e AML nas glândulas salivares menores em nenhuma fase do desenvolvimento.

A AQP5 esteve expressa em botões iniciais de GMs com 22 semana de desenvolvimento (figura 5.11I, ponta de seta), sendo evidenciada de maneira mais intensa em membranas apicais das células acinares (figura 5.11J, ponta de seta) e ductais já nos estágios pseudoglandulares, assumindo um padrão mais organizado e intenso de expressão nos sítios apicais a partir do estágio canalicular (figura 5.11K, ponta de seta). Embora observada de maneira menos intensa, neste tipo glandular, a expressão citoplasmática de AQP5 em ácinos mais desenvolvidos também foi evidente (figuras 5.11K,L, ponta de seta).

Figura 5.11 - Exemplos dos resultados dos ensaios de colocalização das proteínas AQPs 1, 3 e 5 e AML nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas menores (GM)



Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial (ponta de seta) e expressão de AML em vaso sanguíneo (vermelho), espécime língua, 22 semanas, 100x **(A)**; estágio pseudoglandular (ponta de seta), expressão de AML em células mioepiteliais (seta), espécime mucosa jugal, 21 semanas, 100x **(B)**; estágio canalicular (ponta de seta) evidenciando expressão de AQP1 em diversas células basais (ponta de seta), expressão de AML em células mioepiteliais (seta) e colocalização entre AQP1 e AML em microvasculatura (asterisco), espécime lábio, 22 semanas, 40x **(C)**; estágio botão terminal evidenciando fraca expressão de AQP1 em células basais acinares e capilares (ponta de seta), AML expressa em células mioepiteliais (seta), colocalizando-se com AQP1 em alguns sítios mioepiteliais e estruturas vasculares (asteriscos), espécime lábio, 22 semanas, 100x **(D)**; estágio botão inicial, expressão de AQP3 queratinócitos iniciando abertura ductal em assoalho bucal (ponta de seta) e AML expressa em estruturas vasculares (vermelho), 20x **(E)**; estágio pseudoglandular expressando AQP3 em membranas basolaterais acinares (ponta de seta) e AML em células mioepiteliais de ácinos (seta) e tecido vascular (vermelho), lábio, 20 semanas, 40x **(F)**, estágio canalicular exibindo expressão de AQP3 em membranas basolaterais, espécime assoalho, 14 semanas, 40x **(G)**; estágio botão terminal evidenciando expressão citoplasmática e intensa expressão de membranas basolaterais para AQP3 (ponta de seta), AML expressa em microvasculatura (seta), espécime lábio, 22 semanas, 40x **(H)**; estágio botão inicial com expressão difusa de AQP5 em formações acinares (ponta de seta), AML expressa em vasos sanguíneos (seta), língua, 22 semanas, 40x **(I)**; estágio

pseudoglandular evidenciando expressão difusa de AQP5 em citoplasma e majoritariamente em membranas apicais (ponta de seta), AML expressa em vasos sanguíneos (seta), língua, 22 semanas, 40x **(J)**, estágio canalicular expressando AQP5 em formações pré-ductais e acinares com especial intensidade nas formações apicais (ponta de seta), células mioepiteliais (seta) e vasculatura expressando AML, espécime assoalho, 14 semanas, 40x **(K)**; estágio botão terminal evidenciando expressão citoplasmática e principalmente apical de AQP5 (ponta de seta), expressão de AML em células mioepiteliais (seta) e vasos sanguíneos, espécime assoalho, 14 semanas, 40x **(L)**.

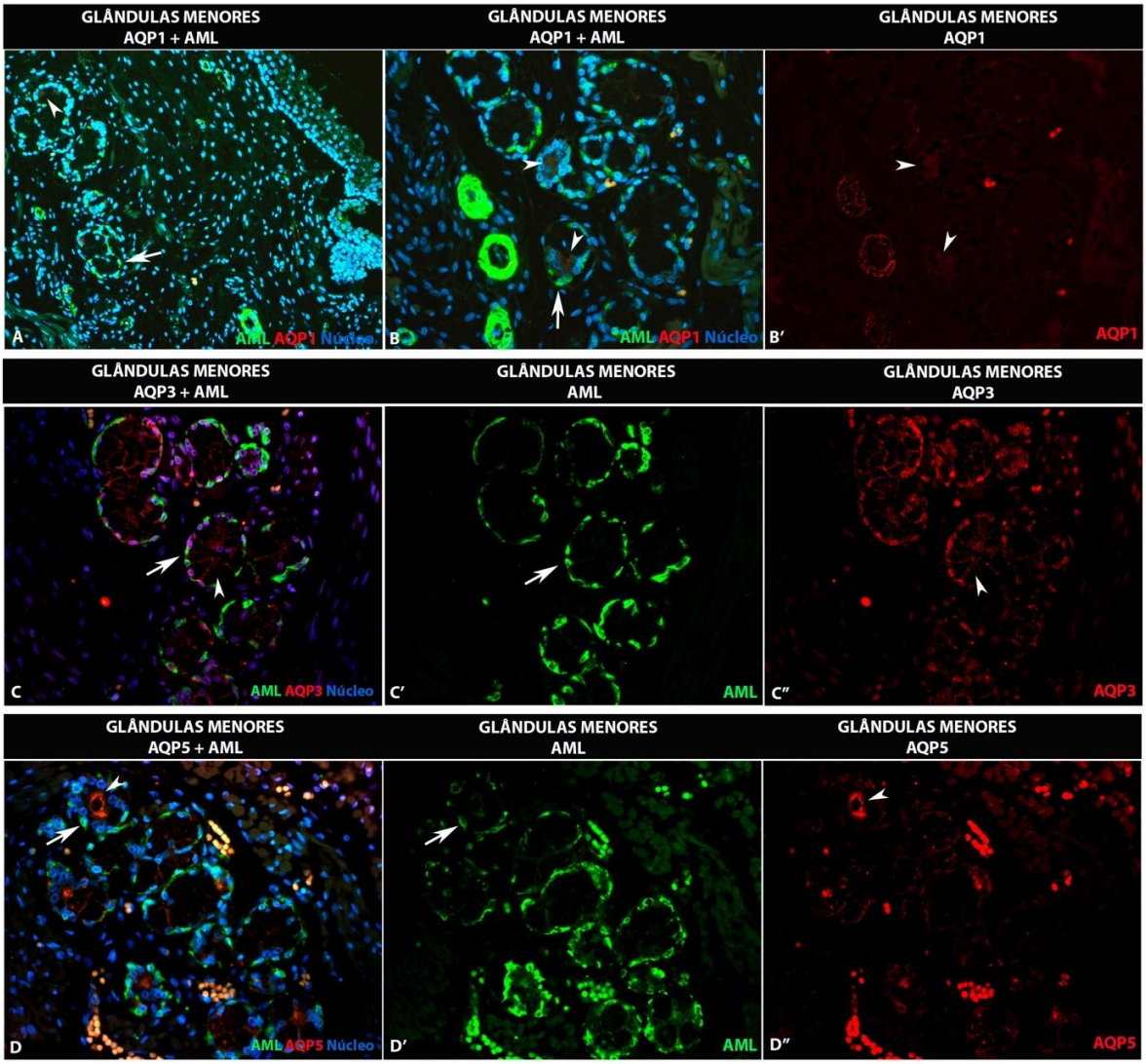
Por meio da técnica de imunofluorescência, foi possível observar a expressão de AML em células mioepiteliais rudimentares a partir da 12ª semana de desenvolvimento em GMs.

A identificação de dupla marcação entre AQP1 e AML por meio de IHC-IF só foi possível com auxílio de filtro triplo, devido à sua fraca intensidade de expressão. AQP1 foi identificada no lúmen acinar de GP com 24 semanas (figura 5.8A pontas de seta) contrastanto, mas não colocalizando com AML nas células mioepiteliais por meio desta técnica. A proteína AQP1 foi negativa para a maioria dos casos de dupla marcação em imunofluorescência. Quando aplicado somente anticorpo AQP1, excluindo-se dupla marcação, AQP1 exibiu expressão muito semelhante aos resultados em IHC-P, além de intensa positividade em testes com controle, não havendo, portanto, colocalização entre AQP1 e AML.

Nas GMs, a expressão de AQP1 foi identificada com fraca intensidade no lúmen acinar (figuras 5.12A-B', ponta de seta). Por meio desta técnica, não foi possível evidenciar expressão de AQP1 na microvasculatura.

AQP3 permaneceu com padrão similar de expressão observado na técnica de IHC-P, mais evidente nas membranas basolaterais acinares algumas vezes identificada de maneira difusa no citoplasma (figuras 5.12C e C'', ponta de seta). AQP5, foi identificada nas membranas apicais acinares (figuras 5.12D e D', ponta de seta).

Figura 5.12 - Exemplos dos resultados de imunofluorescência para colocalização das proteínas AQPs 1, 3 e 5 e AML em glândulas salivares menores



Fonte: a autora.

Possível expressão de AQP1 em célula mioepitelial acinar (ponta de seta) e em células mioepiteliais por meio de AML (seta) **(A)**. Expressão de AQP1 difusa em botão acinar inicial (pontas de setas), expressão de AML em células mioepiteliais (seta) e arteríolas e vasos sanguíneos **(B)**; fraca e difusa expressão de AQP1 em botões acinares (pontas de seta) **(B')**; AML expressa nas células mioepiteliais **(C, C', setas)** e expressão de AQP3 em membranas basolaterais acinares **(C, C'', setas)**; expressão de AML em células mioepiteliais (**D, D'**, setas) e AQP5 expressa essencialmente em membranas apicais acinares (**D, D''**, pontas de seta). Todos os espécimes descritos correspondem a língua na 12a semana de desenvolvimento, aumento 40x.

5.4 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE INERVAÇÃO/ CÉLULAS MIOEPITELIAIS E AQPS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES

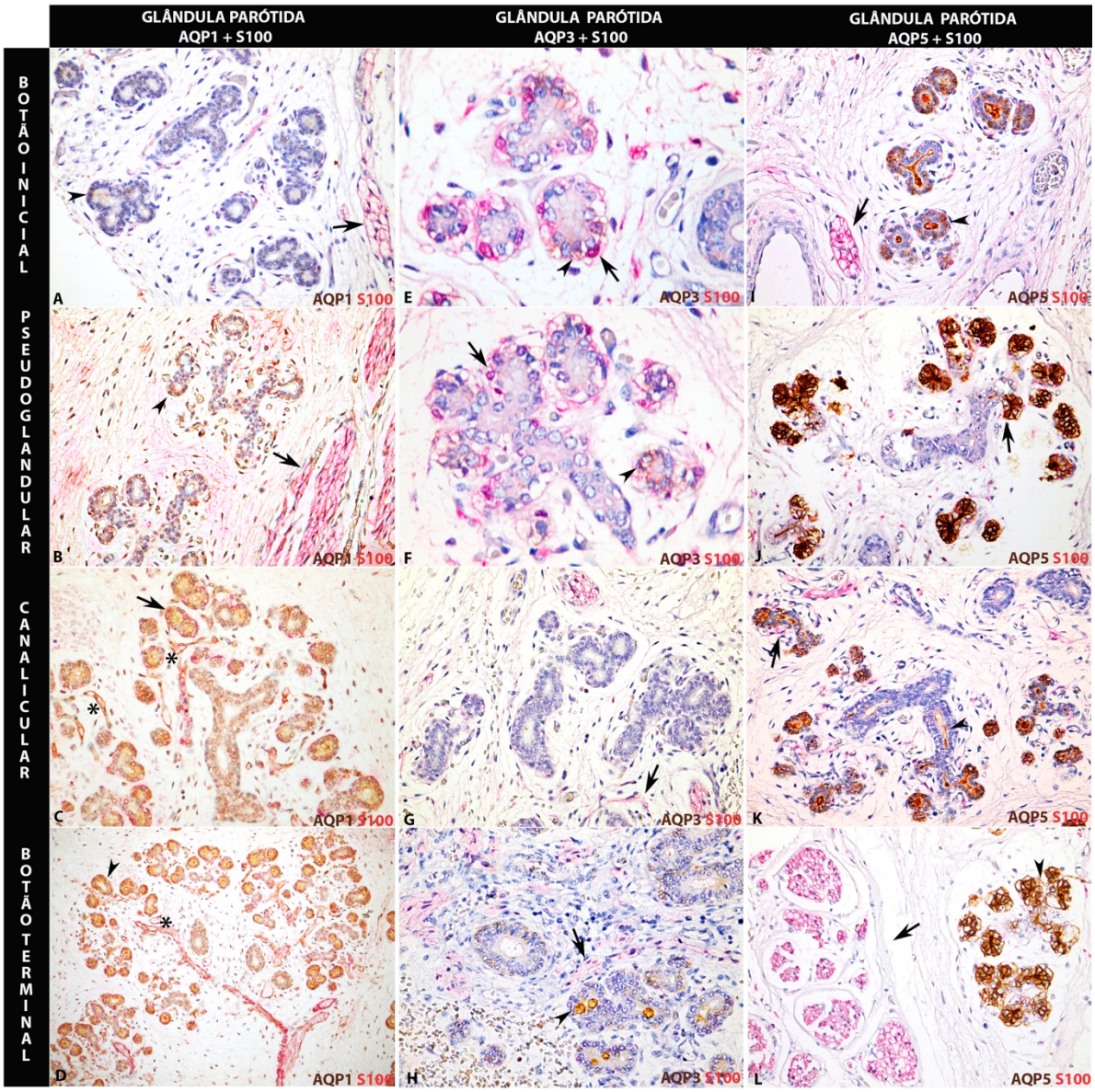
5.4.1 Ensaios de colocalização das proteínas S100 e AQPs 1, 3 e 5 em GP (IHC-P e IHC-IF)

Desde os estágios mais rudimentares até o último estágio de desenvolvimento analisados (24 semanas), foi possível identificar a expressão de S100 em feixes e fibras nervosas difundidas no mesênquima glandular (figuras 5.13A, B,H,I,L, setas). Além de fibras neurais, S100 foi detectado em células mioepiteliais (figuras 5.13E e F, setas) e pericitos de vasos sanguíneos (figuras 5.13C e D, setas).

Houve colocalização entre AQP1 e S100 em alguns sítios mioepiteliais (figura 5.13C, asterisco) e vasculares (figuras 5.13C e D, asterisco).

Não houve colocalização de expressão entre AQP3 e S100 ou entre AQP5 e S100 em nenhum dos sítios glandulares.

Figura 5.13 - Exemplos dos ensaios da colocalização das proteínas AQPs 1, 3 e 5 e S100 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP)



Fonte: a autora.

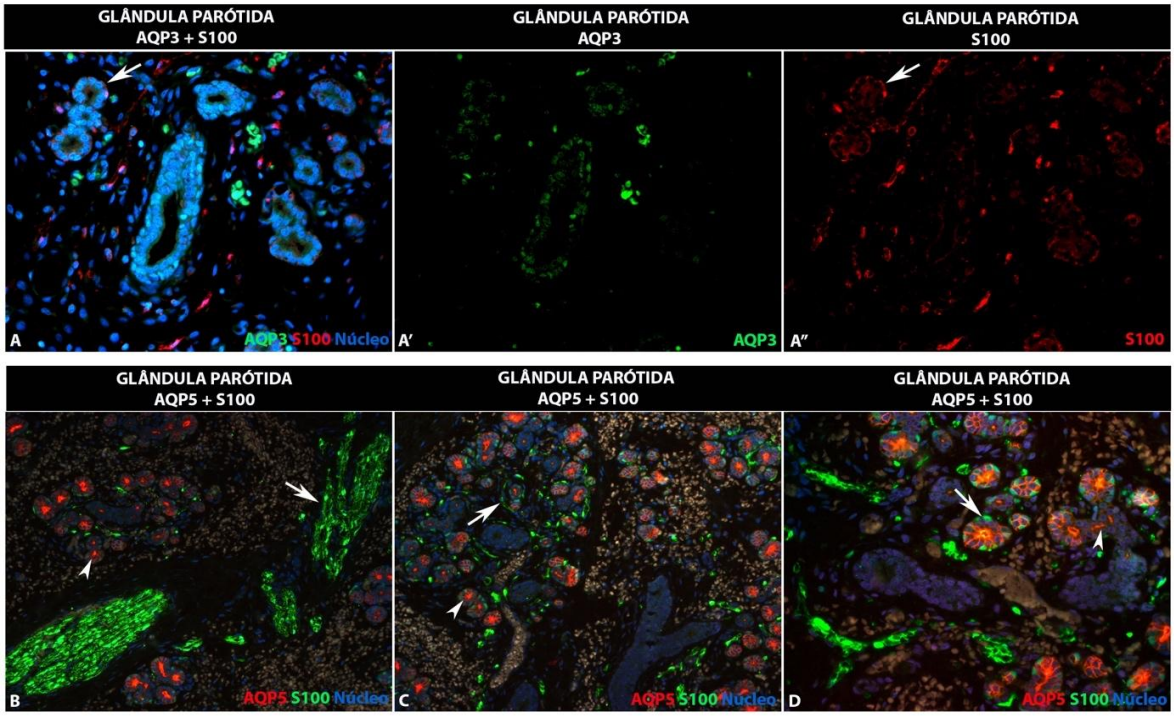
Estágio de botão inicial expressando AQP1 em células basais do parênquima inicial (ponta de seta) e expressão de S100 em feixe nervoso (seta) e finas fibras nervosas, espécime 18 semanas, 40x **(A)**; estágio pseudoglandular evidenciando expressão difusa de AQP1 (ponta de seta), e S100 em feixe nervoso, espécime 18 semanas, 40x **(B)**; estágio canalicular evidenciando expressão difusa de AQP1 em células acinares e ductais (castanho), expressão de S100 em células mioepiteliais acinares (seta) e colocalização entre AQP1 e S100 em alguns sítios endoteliais (asteriscos), 24 semanas, 40x **(C);** estágio botão terminal evidenciando expressão difusa de AQP1 em células acinares (ponta de seta), expressão de S100 em células mioepiteliais acinares e colocalização entre AQP1 e S100 em alguns sítios vasculares (asterisco), 24 semanas, 20x **(D)**; estágio botão inicial, fraca expressão basal de AQP3 (ponta de seta), expressão de S100 em célula mioepitelial intercalando-se entre núcleos celulares pré-acinares (seta), 21 semanas, 100x **(E)**; estágio pseudoglandular evidenciando expressão celular basolateral acinar por AQP3 (ponta de seta), S100 expresso em célula mioepitelial (seta) e arteríola evidenciando expressão de S100 (asterisco), aumento 100x, 21 semanas **(F)**; estágio canalicular evidenciando expressão de S100 também em fibras nervosas, 40x **(G)**; estágio botão terminal com expressão citoplasmática de AQP3 e intensa marcação em membrana basolateral (ponta de seta), S100 expresso em feixes nervosos em torno de ilhas acinares (seta) e ductais, 100x **(H)**; estágio botão inicial com expressão proeminente de AQP5 nas membranas apicais ou lúmen acinar (ponta de seta), expressão de S100 em feixe nervoso

mesenquimal, 40x **(I)**, estágio pseudoglandular expressando AQP5 de forma difusa e, nas membranas apicais, de modo intenso (ponta de seta), 40x **(J)**, estágio canalicular evidenciando expressão de AQP5 em membrana apical de abertura luminal de ducto (ponta de seta), expressão de S100 em finas fibras nervosas enovelando ácinos e formações ductais, 21 semanas, 40x **(K)**; estágio botão terminal exibindo intensa expressão acinar apical de AQP5 (ponta de seta) além de expressão acinar difusa, S100 expresso em evidente porção de feixe nervoso (seta), 21 semanas, 40x **(L)**.

Por meio de IHC-IF a expressão de S100 foi observada em glândulas parótidas desde os períodos mais incipientes de maturação até o último estágio analisado tanto em células mioepiteliais (figuras 5.14A, A" e D, seta), quanto em feixes nervosos bem estabelecidos (figura 5.14B, seta) e fibras nervosas (figura 5.14C, seta).

Em alguns espécimes de glândula parótida em períodos mais iniciais do desenvolvimento (18 semanas), a expressão de AQP3 não pôde ser identificada de maneira evidente (figuras 5.14A e A'). A AQP5 pôde ser identificada de modo intenso na porção luminal de botões acinares e ductos intralobulares.

Figura 5.14 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e S100 em glândulas parótidas



Fonte: a autora.

Ausência da expressão de AQP3 para o espécime em questão (**A** e **A'**), expressão de S100 em células mioepiteliais acinares (**A** e **A"**, setas) e fibras nervosas mesenquimais, 18 semanas, 40x; expressão de AQP5 em membranas apicais acinares, evidenciando preenchimento luminal de botões (**B** e **C**, ponta de seta) e porções luminais intraductais (**D**, ponta de seta), além de expressão de S100 em feixes nervosos (**B**, seta), fibras nervosas (**C**, seta) e células mioepiteliais (**D**, seta). B e C espécime de 24 semanas, 20x; D, espécime 24 semanas, 40x.

5.4.2 Ensaios de colocalização das proteínas S100 e AQPs 1, 3 e 5 na glândula submandibular (IHC-P e IHC-IF)

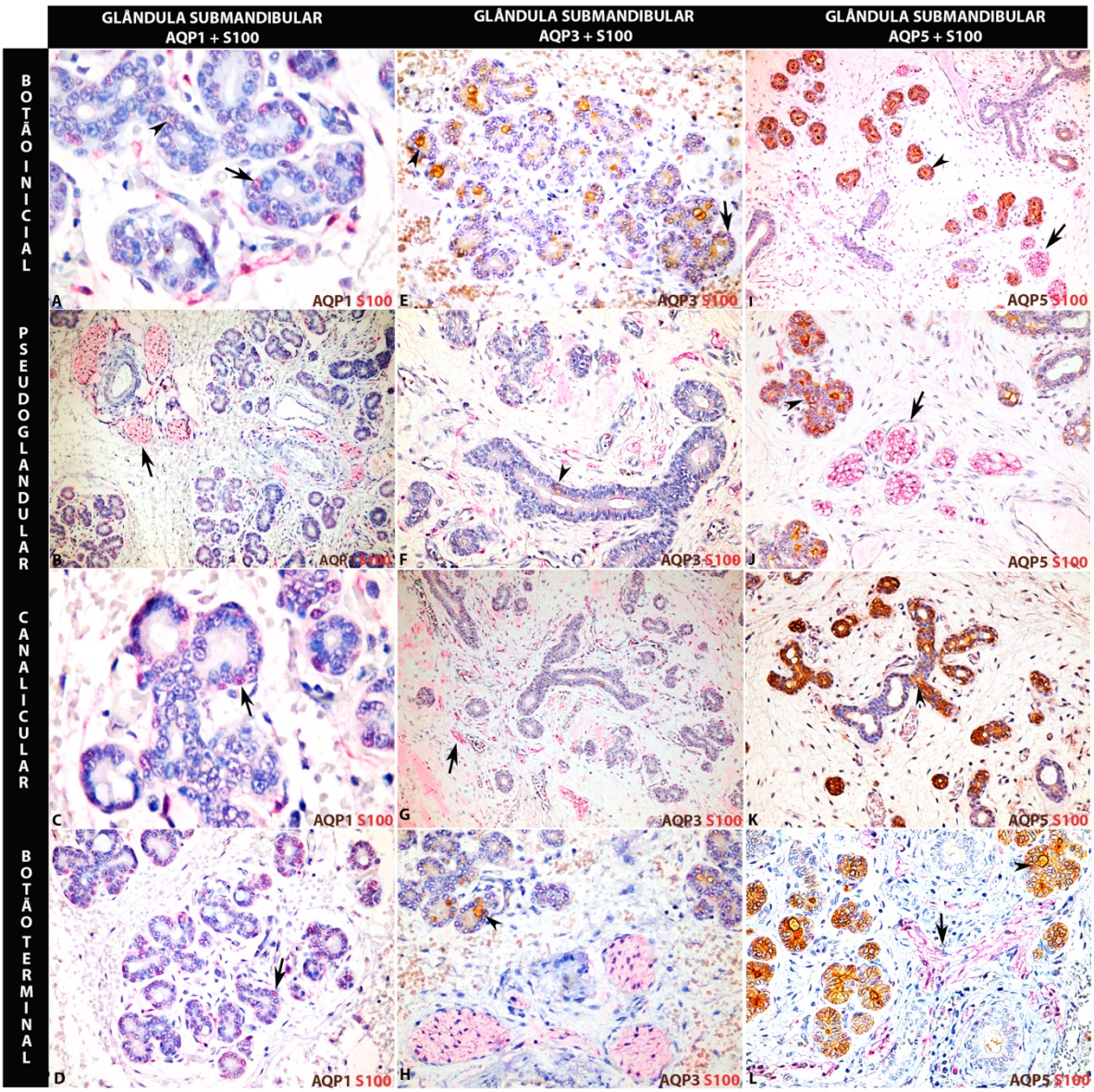
Todos os estágios do desenvolvimento e semanas de maturação da glândula submandibular expressaram S100 em feixes nervosos nos espécimes em que tais estruturas puderam ser identificadas. Células mioepiteliais de ácinos submandibulares também expressaram S100 de modo evidente durante estágios mais avançados do desenvolvimento analisados (24 semanas) (figuras 5.15A, C e D).

Em alguns espécimes de GSM com 24 semanas de desenvolvimento, a expressão de AQP1 foi ausente nas estruturas acinares e ductais (figuras 5.15A-D).

Em alguns espécimes AQP3 não foi identificada nos estágios pseudoglandular e canalicular de GSM com 21 semanas de desenvolvimento (figuras 5.15F-G), células componentes de estruturas acinares em GSM de 24 semanas expressam AQP3 tanto no citoplasma, quanto nas membranas basolaterais destas células isoladas (figura 5.15H, ponta de seta). Não houve colocalização entre AQP3 e S100.

A análise de expressão de AQP5 nos permitiu identificar o mesmo padrão de expressão já descrito para GSMs. Não houve colocalização de expressão entre AQP5 e S100.

Figura 5.15 - Exemplos dos resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e S100 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM)



Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial evidenciando rara expressão de AQP1 e membrana basal de célula acinar (ponta de seta), células mioepiteliais expressas por meio de S100 (seta), espécime de 24 semanas, 100x **(A)**; estágio pseudoglandular expressando S100 em grandes feixes nervosos em torno de estrutura arterial (seta), 24 semanas, 20x **(B)**; estágio canalicular exibindo expressão de S100 em células mioepiteliais acinares (ponta de seta) e em ducto intercalar, espécime de 24 semanas, 100x **(C)**; estágio de botão terminal expressando S100 em células mioepiteliais acinares (seta) e em finas fibras nervosas estromais, espécime de 24 semanas 40x **(D)**; estágio de botão inicial exibindo expressão de AQP1 em membranas basolaterais e citoplasma de células acinares (ponta de seta), 24 semanas, 40x **(E)**; estágio pseudoglandular exibindo expressão de AQP3 em membranas basolaterais de células da composição ductal (cabeça de seta) e S100 expresso em fibras nervosas, espécime 21 semanas, 40x **(F)**; estágio canalicular, S100 expresso em finos feixes nervosos estromais (seta), espécime 21 semanas, 20x **(G)**; estágio de botão terminal evidenciando AQP3 expressa citoplasma e membranas basolaterais acinares (cabeça de seta) e S100 expresso em feixes nervosos, espécime 24 semanas, 40x **(H)**; estágio de botão inicial evidenciando expressão citoplasmática difusa e majoritária em membranas apicais acinares (cabeça de seta) e S100 exibindo expressão em feixes nervosos no estroma glandular (seta), 19 semanas, 20x **(I)**, AQP5 expressa em membranas laterais e apicais do estágio pseudoglandular (cabeça de seta), S100 expresso em feixes nervosos, 19 semanas, 40x **(J)**; expressão acinar e ductal intercalar difusa de AQP5 em estágio

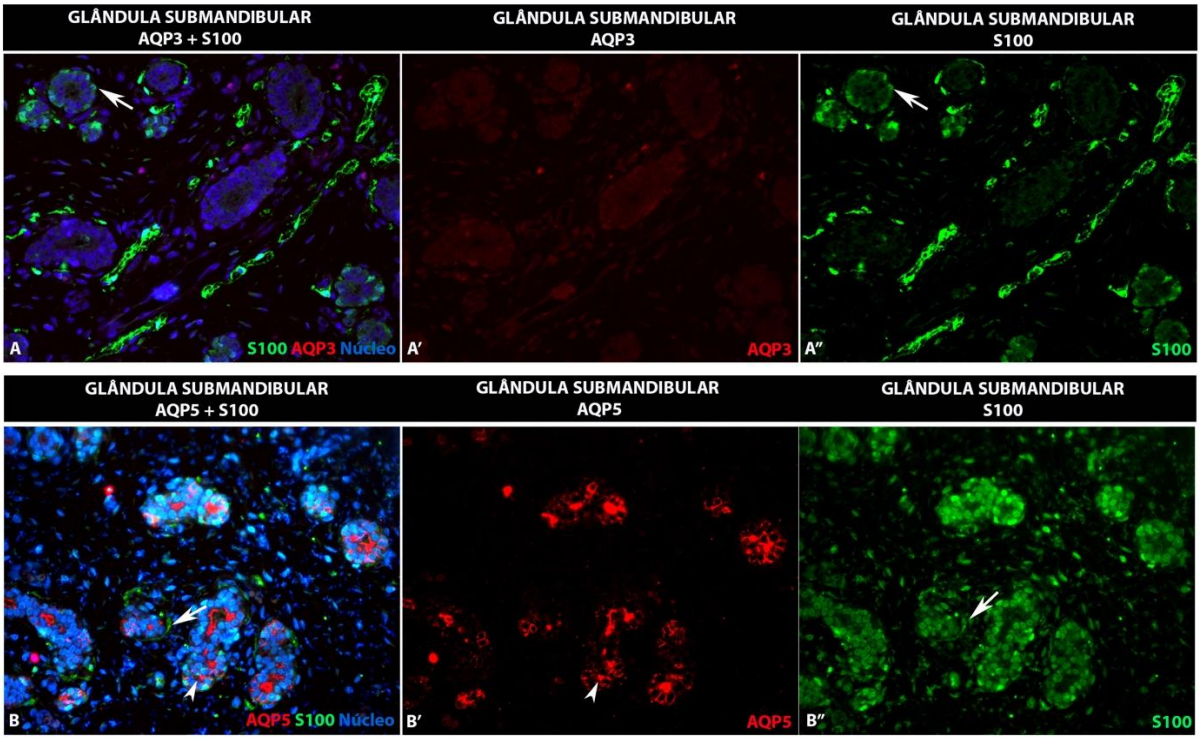
canalicular (cabeça de seta), 18 semanas, 40x **(K)**; estágio de botão terminal expressando AQP5 de modo difuso, porém, majoritariamente nas membranas apicais acinares (cabeça de seta) e S100 evidenciando feixe nervoso acompanhando ácinos no estroma glandular (seta), 24 semanas, 40x **(L)**.

A expressão de S100 também foi observada em glândulas submandibulares desde os períodos mais incipientes de maturação até o último estágio analisado tanto em células mioepiteliais (figuras 5.16A e A", seta), quanto em fibras nervosas (figuras 5.16B e B", seta).

A expressão de AQP3 em GSMs foi identificada por meio de IHC-IF em diversos espécimes durante períodos mais iniciais do desenvolvimento (19 semanas) no espécime em questão (figuras 5.16A e A').

A proteína AQP5 pôde ser identificado de modo intenso na porção luminal de botões acinares (figuras 5.16B e B', ponta de seta) e de ductos intralobulares ainda em que em estágios mais iniciais (18 semanas).

Figura 5.16 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e S100 em glândulas submandibulares



Fonte: a autora.

Ausência da expressão de AQP3 em GSM (A e A'), expressão de S100 em células mioepiteliais acinares (A e A", setas) e fibras nervosas mesenquimais, 19 semanas, 40x; expressão de AQP5 em membranas apicais acinares, (B e B', ponta de seta), expressão de S100 em fibras nervosas enovelando botões acinares (B e B", seta), espécime 18 semanas, 40x.

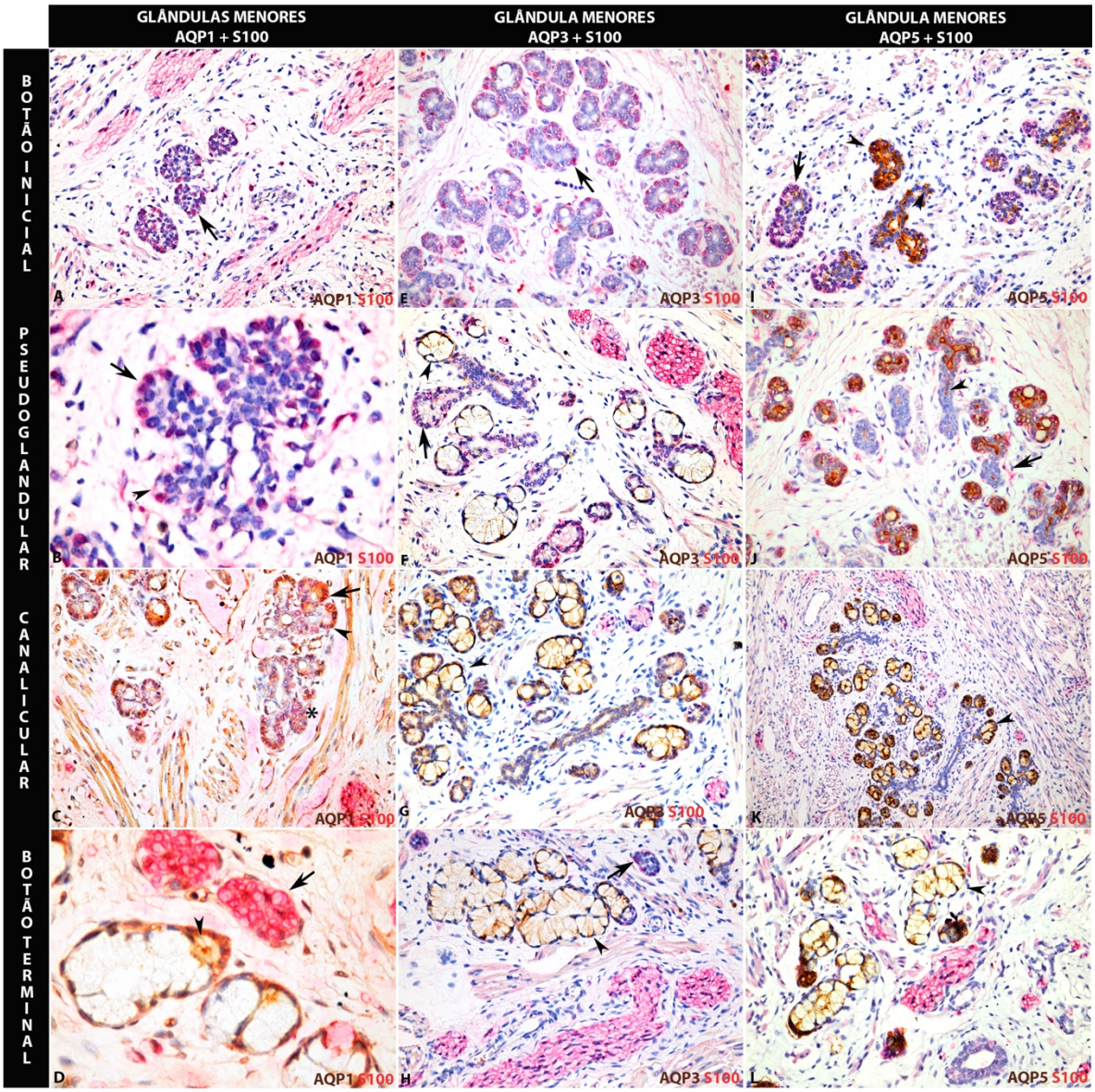
5.4.3 Ensaios de colocalização das proteínas S100 e AQPs 1, 3 e 5 nas glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF)

As glândulas salivares menores evidenciaram expressão intensa de S100 tanto em estruturas de feixes e fibras nervosos (figuras 5.17D, F, H e L, seta), quanto em células mioepiteliais (figuras 5.17A e B ponta de seta) e algumas estruturas vasculares (pericitos) nos diversos períodos e estágios do desenvolvimento glandular.

Como as GMs se desenvolvem de maneira mais precocemente, estruturas acinares expressam AQP1, já na 23ª semana (figura 5.17C, ponta de seta) e 18ª semanas de desenvolvimento, (figura 5.1D, ponta de seta) nas células mioepiteliais que enovelam porções de ducto intercalar (figura 5.17D, ponta de seta). Houve colocalização de expressão entre AQP1 e S100 nas células mioepiteliais (figura 5.17C, asterisco).

As aquaporinas 3 e 5 permaneceram com o mesmo padrão já descrito nas GM e não houve colocalização entre essas proteínas e S100 em nenhuma fase do desenvolvimento glandular.

Figura 5.17 - Exemplos dos resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e S100 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas menores (GM)



Fonte: a autora.

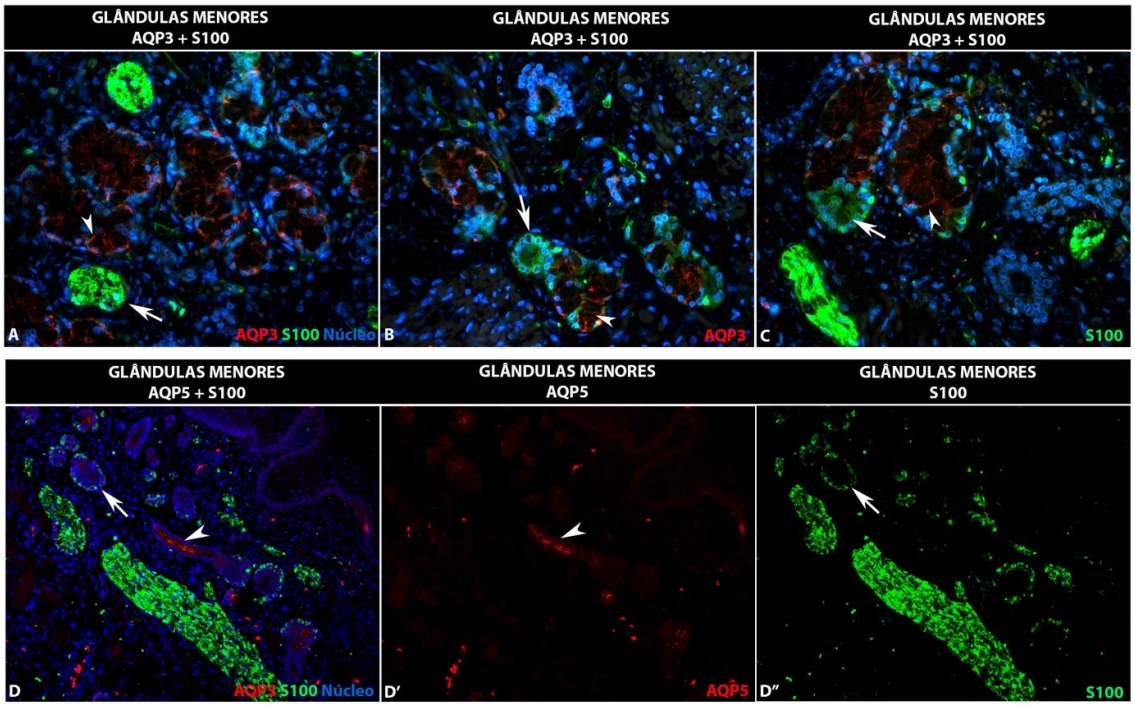
Estágio de botão inicial, evidenciando expressão de S100 em células mioepiteliais (seta) bem como em feixes nervosos, espécime língua, 12 semanas, 40x **(A)**; estágio pseudoglandular exibindo expressão de AQP1 em microvasculatura (ponta de seta), expressão de S100 em células mioepiteliais, espécime língua, 12 semanas, 100x **(B)**; estágio canalicular expressando AQP1 em possíveis células mioepiteliais (ponta de seta), S100 expresso em células mioepiteliais acinares (seta) e colocalização entre AQP1 e S100 em possíveis células mioepiteliais de ácinos mucosos (asterisco), espécime língua, 23 semanas, 40x **(C)**; estágio botão terminal, expressando AQP1 em células mioepiteliais nas porções de ducto intercalar, expressão de S100 em feixe nervoso (seta), espécime assoalho, 18 semanas 100x **(D)**; estágio botão inicial, exibindo expressão de S100 em células mioepiteliais, espécime de assoalho, 14 semanas, 40x **(E)**; estágio pseudoglandular expressando AQP3 em membranas basolaterais acinares mucosas (ponta de seta), expressão de S100 em células mioepiteliais acinares (seta) e feixes nervosos, espécime assoalho, 18 semanas, 40x **(F)**; estágio canalicular expressando AQP3 membranas basolaterais acinares e difusa em citoplasma de modo menos intenso (ponta de seta), expressão de S100 em fibras e feixes nervosos (vermelho), espécime de língua, 22 semanas, 40x **(G)**; estágio botão terminal evidenciando expressão citoplasmática de AQP3 (ponta de seta), S100 expresso em célula mioepitelial (seta) e evidente em feixe nervoso longitudinal, espécime lábio, 22 semanas, 40x **(H)**; estágio botão inicial expressando AQP5 de modo difuso porém mais evidente em membranas apicais acinares (ponta de

seta), expressão de S100 em células mioepiteliais (seta) e fibras nervosas, espécime de língua, 12 semanas, 40x **(I)**; estágio pseudoglandular expressando AQP5 majoritariamente em membrana apical acinar e abertura luminal inicial de ducto intercalado (ponta de seta), S100 evidenciando expressão em finas fibras nervosas, espécime assoalho, 14 semanas, 40x **(J)**, estágio canalicular AQP5 expressa em citoplasma e de modo mais organizado nas membranas apicais acinares (ponta de seta), S100 expresso em feixes e finas fibras nervosas (vermelho), espécime língua, 22 semanas, 20x **(K)**; estágio botão terminal evidenciando expressão citoplasmática difusa de AQP5 sendo identificada de modo mais intenso nas membranas apicais (ponta de seta), feixes e fibras nervosas evidenciando expressão de S100, espécime língua, 23 semanas, 40x **(L)**.

A expressão de S100 foi identificada de modo intenso em glândulas salivares menores também por meio de imunofluorescência em feixes nervosos (figura 5.18A, seta), nas células mioepiteliais (figura 5.18D, seta) e no citoplasma das células mioepiteliais que enovelam ductos (figuras 5.18, setas B e C).

Estruturas acinares menores com 12 semanas de desenvolvimento morfologicamente compatíveis com estágios de botão terminal expressam AQP3 nas membranas basolaterais acinares de modo intenso (figura 5.18A-C, ponta de seta) e AQP5 em lúmen ductal (D e D', seta) e em membranas apicais acinares.

Figura 5.18 - Exemplos dos resultados de imunofluoresciencia com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e S100 em glândulas salivares menores



Fonte: a autora.

Expressão de AQP3 nas membranas basolaterais acinares (**A** - **C**, ponta de seta) e S100 em feixes nervosos (**A**, seta), mioepitélio ductal intercalar (**B** e **C**, seta), espécime língua, 12 semanas, 40x; expressão de AQP5 em lúmen ductal (**D** e **D'**, ponta de seta) e expressão de S100 em células mioepiteliais (**D** e **D''**, seta), espécime língua, 23 semanas, 20x.

5.5 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE INERVAÇÃO AUTÔNOMA E AQPS EM GLÂNDULAS SALIVARES MAIORES E MENORES

5.5.1 Ensaios de colocalização das proteínas Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 na glândula parótida (IHC-P e IHC-IF)

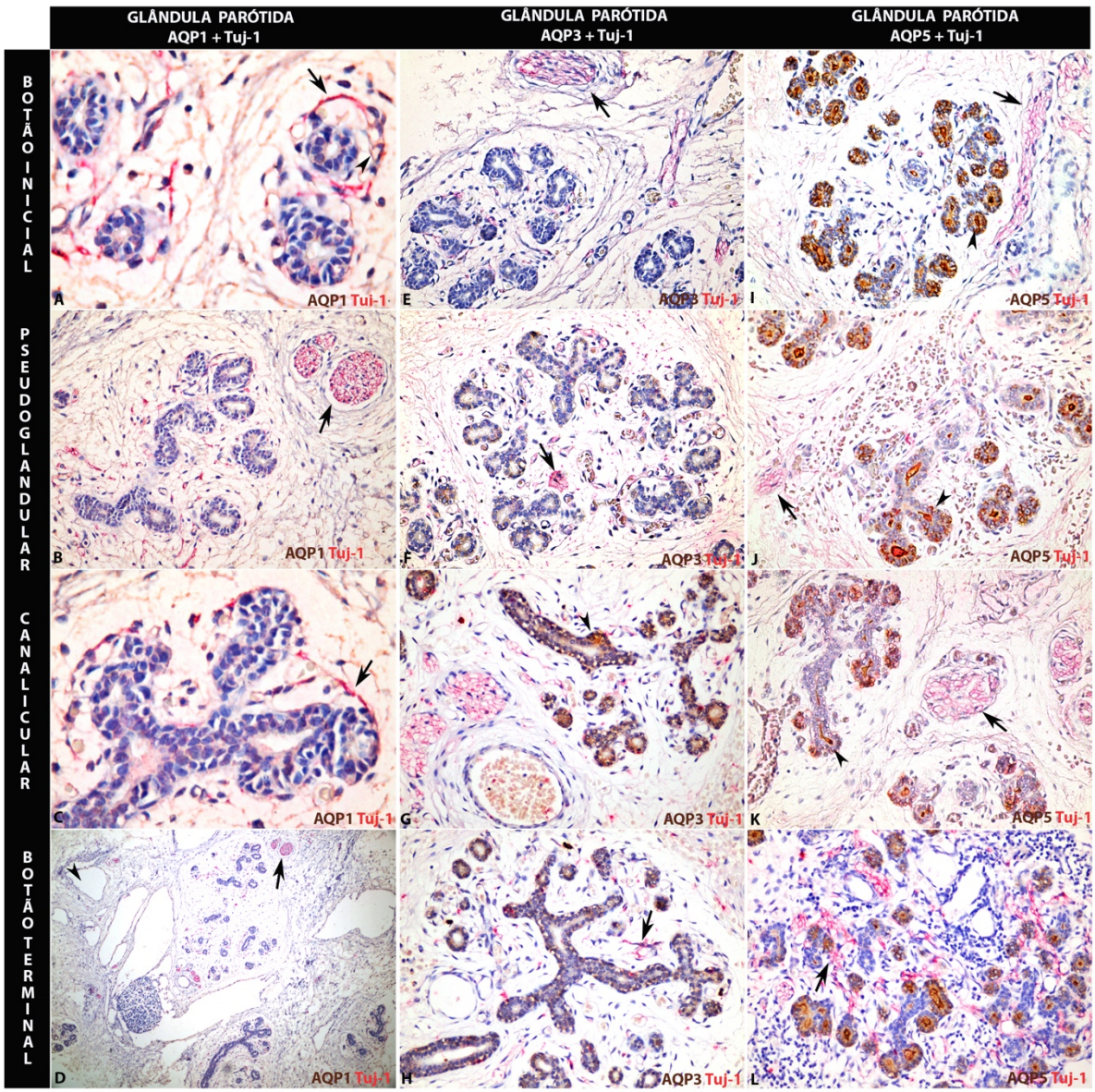
A inervação autônoma simpática e parassimpática foi observada neste estudo por meio da proteína anti-tubullina (Tuj-1).

A proteína Tuj-1 foi identificada em feixes e fibras nervosas no estroma glandular parotídeo em todos os estágios e semanas do desenvolvimento estudados. A expressão de Tuj-1 foi também identificada em feixes nervosos de grande porte (figuras 5.19B,G,K, seta), e delicadas fibras nervosas que, muitas vezes acompanham e tocam estruturas acinares e ductais de maneira evidente, ainda nos estágios mais iniciais estudados (figuras 5.19A e C, seta). Ainda, foi possível observar uma bem estruturada rede de fibras nervosas enovelando ácinos e ductos distribuída amplamente no mesênquima glandular mais desenvolvido (22ª semana) (figuras 5.19L, seta).

A proteína Tuj-1 exibiu um padrão de expressão específico em fibras e feixes nervosos. Não houve colocalização entre Tuj-1 e AQPs 1, 3 ou 5.

Em alguns casos, a GP não exibiu um padrão acinar que configure estágios de botão terminal mesmo em semanas mais avançados do desenvolvimento. As imagens representativas de botão terminal, nesses casos, foram registradas a partir dos sítios teciduais de parênquima mais representativos, evidenciados nesta prancha na 4ª semana de desenvolvimento (figura 5.19D), a 21ª semana (figura 5.19H) e 22ª semana gestacionais (figura 5.19L).

Figura 5.19 - Exemplos de resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e Tuj-1 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas parótidas (GP)



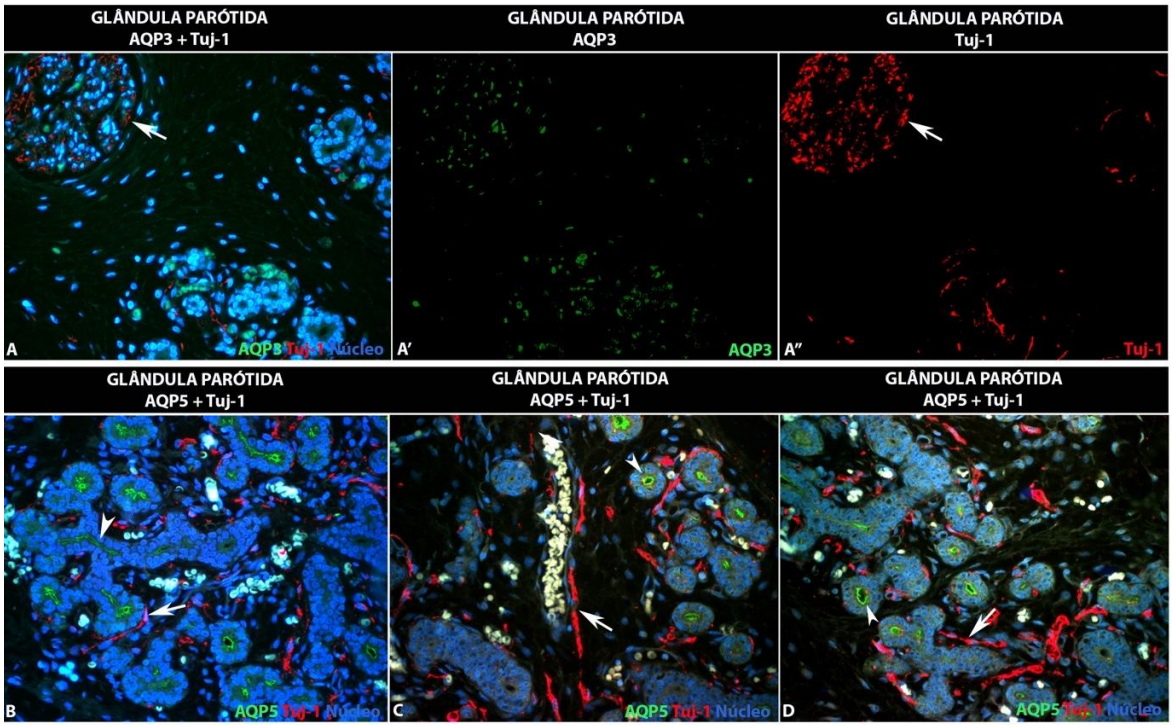
Fonte: a autora.

Estágio de botão inicial evidenciando expressão de AQP1 em estruturas endoteliais (ponta de seta) comunicando-se com fibra autonômica expressa por meio de Tuj-1(seta), espécime de 4 semanas, 100x **(A)**; estágio pseudoglandular evidenciando expressão de Tuj-1 em feixe nervoso autonômico (seta), 40x **(B)**; estágio canalicular exibindo expressão de AQP1 em finos feixes nervosos que chegam a tocar o epitélio glandular em formação (seta), 4 semanas, 100x **(C)**; imagem representando botão terminal em GP cm 4 semanas de desenvolvimento 10x **(D)**; estágio botão inicial exibindo expressão de Tuj-1 em feixes (seta) e finas fibras nervosas, 4 semanas, 40x **(E)**; estágio pseudoglandular expressando AQP3 de maneira fraca e difusa em epitélio acinar e Tuj-1 em fibra nervosa (seta), 22 semanas, 40x **(F)**, estágio canalicular expressando AQP3 em membranas basolaterais de ductos (ponta de seta) e ácinos, exibindo também expressão citoplasmática em ambos os tipos celulares, expressão de TUJ1 em feixe nervoso (vermelho), 21 semanas, 40x **(G)**; estágio botão terminal evidenciando expressão de AQP3 em citoplasma e membranas basolaterais de diversas células (castanho), expressão de TUJ1 em finas fibras autonômicas (seta), 21 semanas, 40x **(H)**; estágio botão inicial evidenciando expressão difusa de AQP5 porém majoritária em membranas apicais (ponta de seta), expressão de Tuj-1 em feixe autonômico exibindo corte longitudinal, espécime de 22 semanas, 40x **(I)**, estágio pseudoglandular exibindo expressão de AQP5 em lúmen ductal (ponta de seta) e membranas apicais acinares de modo intenso, Tuj-1 exibindo expressão em feixe nervoso (seta), 22 semanas, 40x **(J)**, estágio canalicular evidenciando

expressão de AQP5 em lúmen ductal intralobular (ponta de seta) e em membranas basais e apicais acinares (ponta de seta), Tuj-1 expresso em feixe nervoso autônomo (seta), 13 semanas, 40x **(K)**; estágio botão terminal exibindo expressão para AQP5 de maneira difusa porém majoritária em membranas apicais acinares (castanho), finos feixes nervosos autônomos expressando Tuj-1 enovelam o parênquima glandular, 22 semanas, 40x **(L)**.

Por meio de imunofluorescência, pudemos observar um padrão de expressão intenso para Tuj-1 em células componentes de feixes nervosos autonômicos (figuras 5.20A e A", seta), fibras nervosas enovelando botões acinares parotídeos (figura 5.20B, seta), ductais (figura 5.2D, seta) e agregados à paredes vasculares durante o desenvolvimento (figura 5.20C, seta). A proteína AQP3 não pode ser identificada de modo contudente em glândulas parótidas de 18 semanas, enquanto AQP5 exibiu intenso padrão de expressão em espécimes representados na figura 5.20 entre a 16ª e 22ª semana de desenvolvimento tanto em abertura luminal intraductal quanto em sítios apicais acinares.

Figura 5.20 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e Tuj-1 em glândulas parótidas



Fonte: a autora.

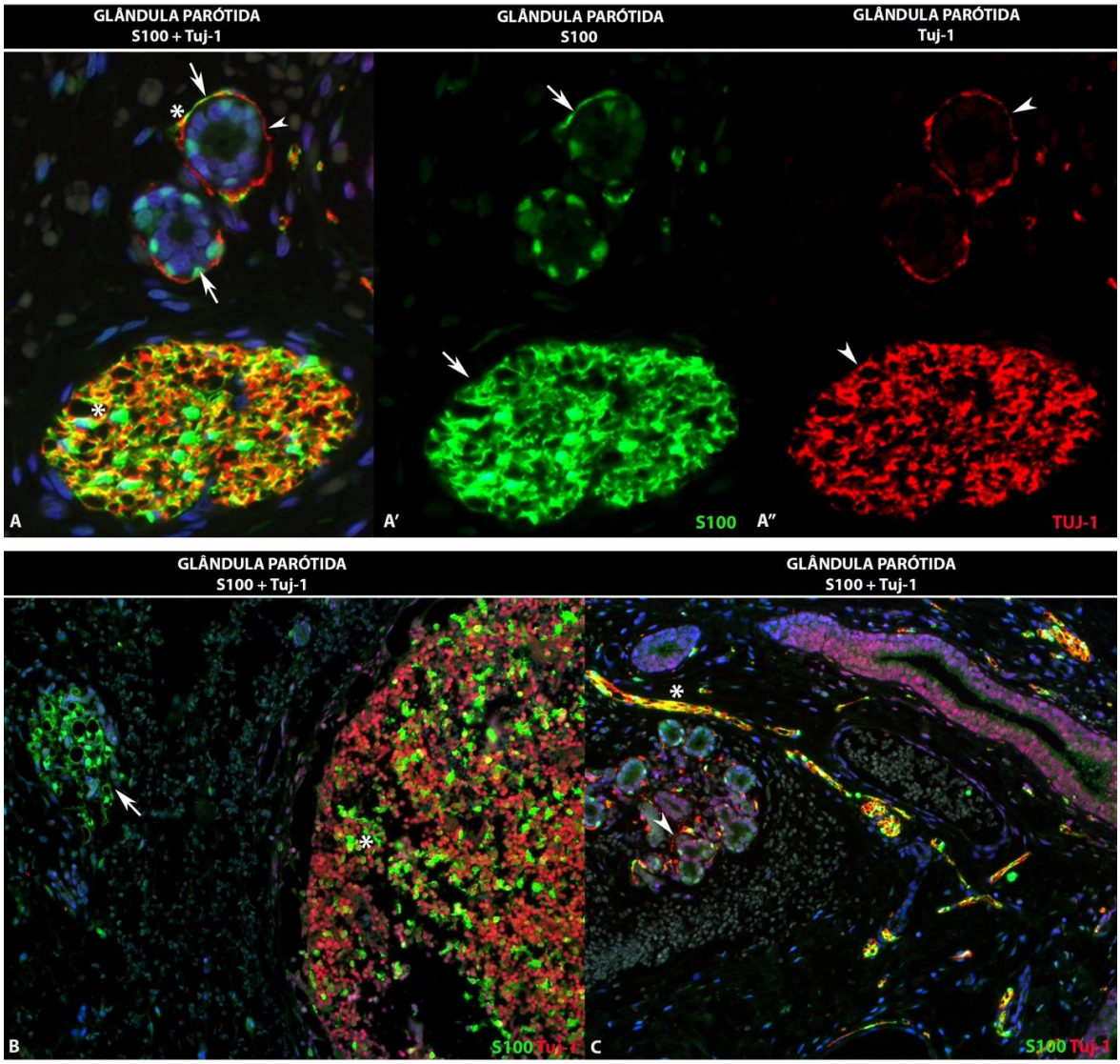
Ausência da expressão de AQP3 em GP (**A** e **A'**), expressão de Tuj-1 em células autonômicas compondo feixes nervosos (**A** e **A"**, setas) e fibras nervosas mesenquimais, 18 semanas, 40x; expressão de AQP5 em membranas apicais ductais (B, ponta de seta) e acinares (C e D, ponta de seta), além de expressão de Tuj-1 em fibras nervosas enovelando estruturas acinares (**B**, seta), ductais (D, seta) e acompanhando estruturas da parede de vasos sanguíneos (**C**, seta). B, espécime de 16 semanas, 40x; C e D espécime de 22 semanas 40x.

Para alguns espécimes, foi realizada a dupla marcação entre S100 e Tuj-1. A análise feita por meio de IHC-IF nos permitiu identificar colocalização entre as duas proteínas em feixes fibras nervosas mesenquimais da GP (figuras 5.21A, B e C, asteriscos).

Em alguns sítios, foi possível observar expressão isolada de S100 em células mioepiteliais e fibras nervosas (figuras 5.21A e A', setas), feixes nervosos (figura 5.21A', seta). Tal expressão intercalou, na mesma sequência, com a expressão isolada de Tuj-1 em fibras nervosas autonômicas (figuras 5.21A e A", setas) e feixes nervosos (figura 5.21A" ponta de seta).

Com isso, uma mesma fibra ou feixe nervoso pode apresentar sítios que expressaram somente S100 (figura 5.21B, seta), sítios que expressaram somente Tuj-1 (figura 5.21C, ponta de seta) e sítios em que houve colocalização de ambas proteínas (figuras 5.21A, B e C, asterisco).

Figura 5.21 - Exemplos de resultados de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre S100 e Tuj-1 em glândulas parótidas na 24ª semana de desenvolvimento



Fonte: a autora.

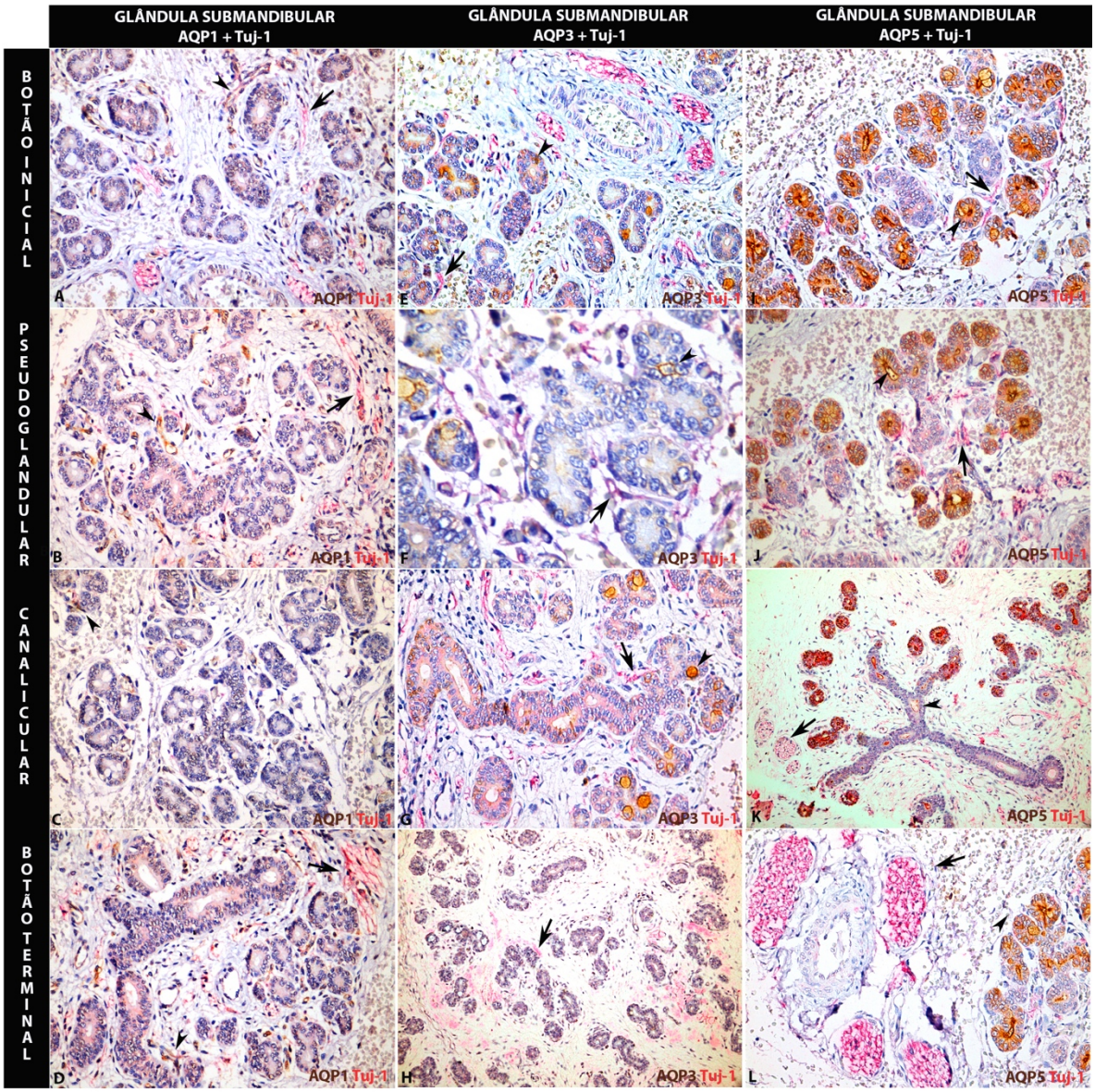
Expressão S100 em feixe nervoso de maior porte colocalizando alguns sítios nervosos com Tuj-1 (**A**, asterisco); expressão de S100 em células mioepiteliais, feixes e fibras nervosas enovelando porções acinares **(A** e **A'**, seta**)**; expressão de Tuj-1 em fibras nervosas autonômicas (**A** e **A'**, ponta de seta) e em feixe nervoso de maior porte (**A'',** ponta de seta); expressão de S100 de modo isolado em feixe nervoso (seta) e em feixe nervoso de maior porte, além de expressão de Tuj-1 em feixe nervoso (ponta de seta), colocalizando em algumas estruturas em feixe de maior porte (asterisco) **(B)**, expressão de S100 e Tuj-1 em fibras nervosas distendidas ao longo do mesênquima parotídeo onde há evidência de colocalização na maior parte da estrutura (asterisco), bem como enovelando porções acinares exibindo expressão em células mioepiteliais e fibras nervosas (seta e fibras nervosas (ponta de seta), também colocalizando-se nesses sítios (asterisco) **(C)**. A e B aumento 40x; C, aumento 20x.

5.5.2 Ensaios de colocalização das proteínas Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 em glândulas submandibulares (IHC-P e IHC-IF)

A inervação autônoma foi evidenciada por meio de Tuj-1 em feixes e fibras nervosas (figura 5.22A-L, setas) em todos os estágios e semanas do desenvolvimento analisados em GSMs a partir da 12ª semana de desenvolvimento, onde espécimes deste tipo glandular foram submetidos à dupla marcação.

O padrão de expressão das AQP's foi o mesmo para GSM descritas anteriormente e não houve nenhum colocalização entre Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5.

Figura 5.22 - Exemplos dos resultados de ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e Tuj-1 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas submandibulares (GSM)



Fonte: a autora.

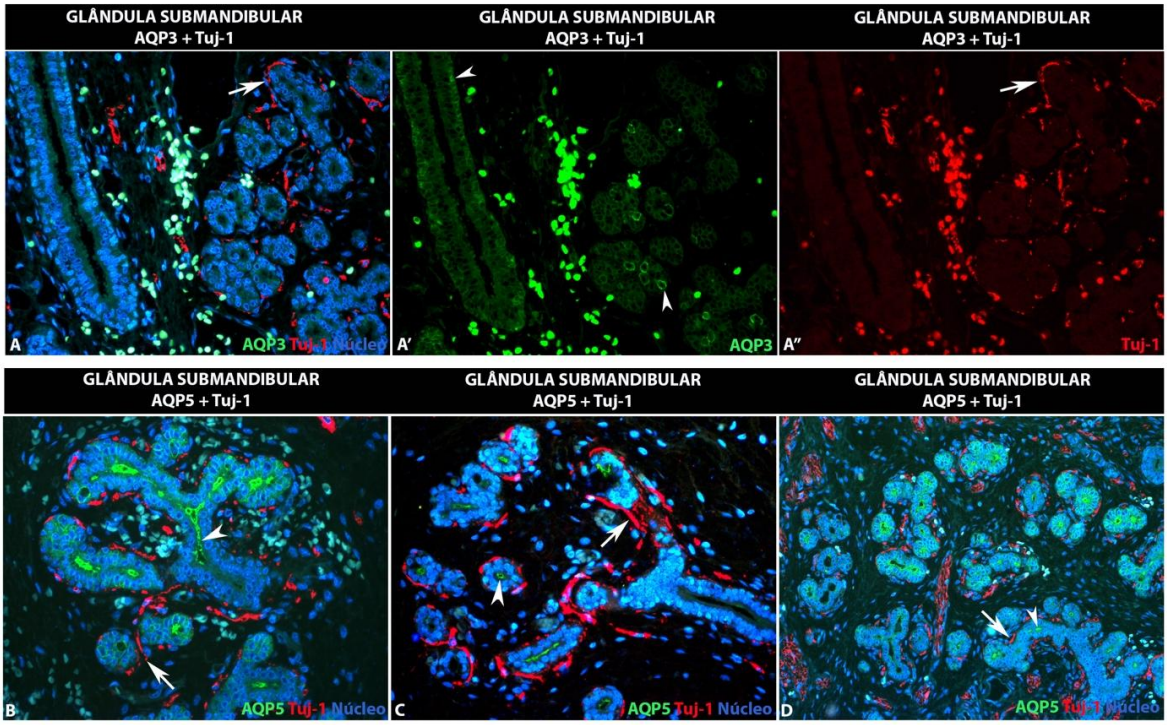
Estágio de botão inicial exibindo expressão de AQP1 em vasos sanguíneos (ponta de seta) e expressão basal em diversas células pro-acinares, expressão de Tuj-1 fibras (seta) e feixes nervosos autonômicos, 24 semanas, 40x **(A)**; estágio pseudoglandular exibindo expressão de AQP1 na microvasculatura (cabeça de seta), expressão de Tuj-1 em fibras nervosas (seta) ao longo do tecido mesenquimal, 24 semanas, 40x **(B)**; estágio canalicular expressando AQP1 em microvasculatura (ponta de seta), 24 semanas, 40x **(C)**; estágio de botão terminal evidenciando expressão de AQP1 em vasos sanguíneos (ponta de seta) e Tuj-1 em feixe nervoso, 24 semanas, 40x **(D)**; estágio de botão inicial, expressão de AQP3 em células de estruturas ductais (ponta de seta) e membranas basolaterais e citoplasma de células acinares, Tuj-1 expresso em fibras nervosas (seta) e feixes nervosos, 24 semanas, 40x **(E)**; estágio pseudoglandular evidenciando expressão de AQP3 em membranas basolaterais de células acinares (ponta de seta) e em citoplasma, Tuj-1 expresso em fibras nervosas enovelando porções parenquimais (seta), 24 semanas, 100x **(F)**, estágio canalicular expressando AQP3 em citoplasma de diversas células acinares exibindo maior intensidade em membranas basolaterais acinares, 24 semanas, 40x **(G)**; imagem representando estágio de botão terminal (ponta de seta), Tuj-1 expresso em fibras autonômicas, 21 semanas, 20x **(H)**; estágio botão inicial expressando AQP5 de forma difusa porém majoritária em membranas apicais, Tuj-1 expresso em fibras nervosas enovelando parênquima glandular de forma difusa, 24 semanas, 40x **(I)**, estágio pseudoglandular, 24 semanas, 40x (J); estágio canalicular evidenciando expressão intensa e difusa

de AQP5 também em membranas apicais de abertura luminal de ducto (ponta de seta), feixes (seta) e fibras nervosas autonômicas expressando Tuj-1, 19 semanas, 20x **(K)**; estágio botão terminal, expressão citoplasmática de AQP5 evidenciando maior intensidade em membranas apicais (ponta de seta), grande feixes nervosos autônomos exibindo expressão de Tuj-1 (seta) formados em torno de estrutura arterial (asterisco) em GSM de 24 semanas, aumento 40x **(L)**.

A expressão de Tuj-1 em fibras nervosas pôde ser identificada de modo evidente nas glândulas submandibulares analisadas por meio de IHC-IF. Uma rede intrincada de inervação autônoma se faz presente no mesênquima glandular durante o desenvolvimento enovelando tanto estruturas acinares quanto ductais (figura 5.23, setas).

Por meio de IHC-IF a expressão da AQP3 foi detectada em células basais de estruturas ductais e membranas basolaterais de células componentes de botões acinares (figura 5.23A', pontas de seta) e a expressão de AQP5 em espaços luminais de ductos intralobulares (figuras 5.23B e D, ponta de seta) e porções apicais acinares (figura 5.23C, pontas de seta).

Figura 5.23 - Exemplos dos resultados de ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e Tuj-1 em glândulas submandibulares



Fonte: a autora.

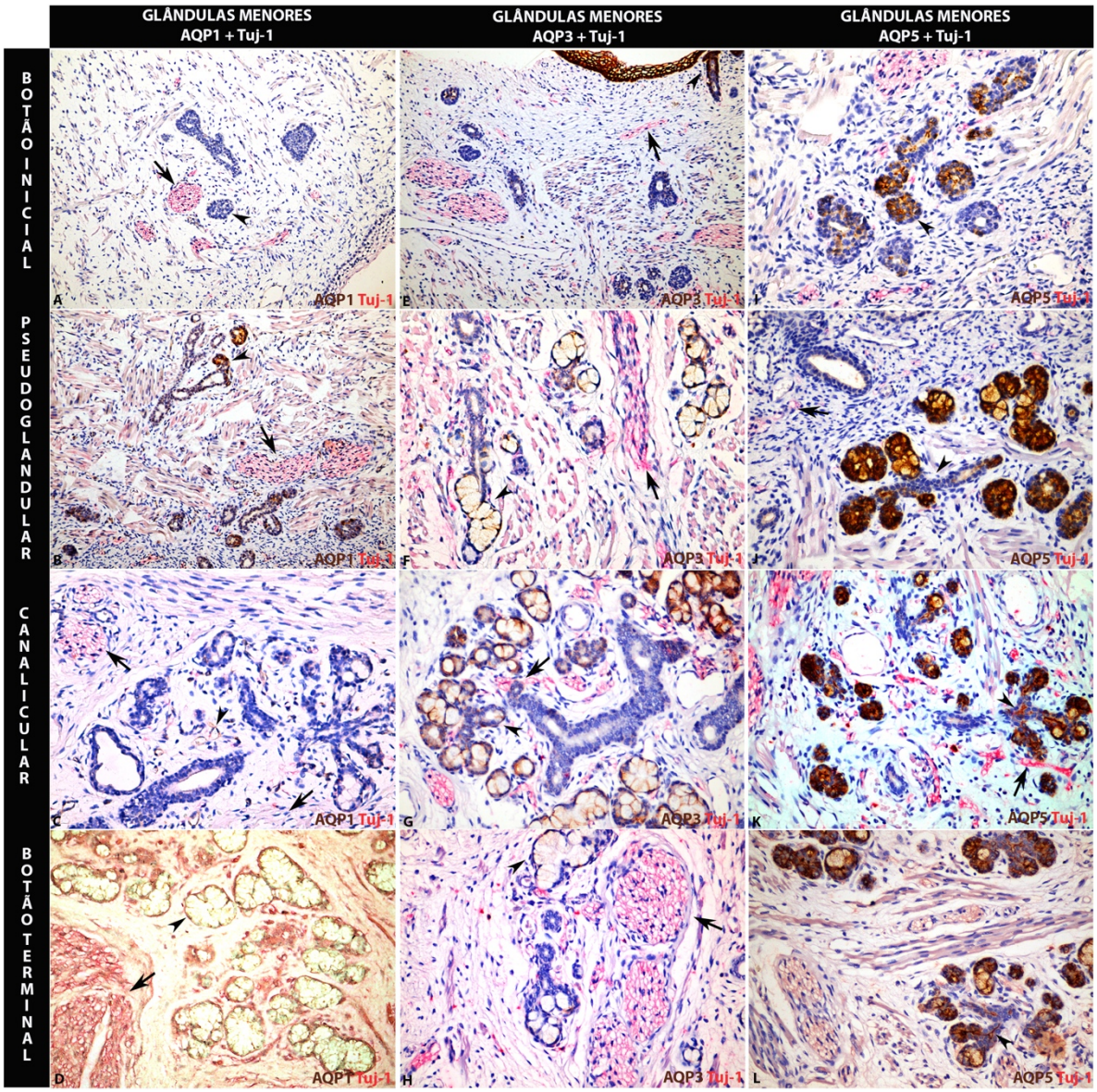
Expressão de AQP3 em células basais de estruturas ductais e membranas basolaterais de células acinares (**A'** pontas de seta), expressão de S100 em fibras nervosas mesenquimais enovelando ácinos (**A** e **A"**, seta), 21 semanas, 40x; expressão de AQP5 em lúmen ductal (**B** e **D**, ponta de seta) e membranas apicais acinares (C, ponta de seta), intensa expressão de Tuj-1 em fibras nervosas (**B**, seta), fibras nervosas enovelando porções acinares e ductais (**B**, 19 semanas, 40x; C, 18 semanas, 40x; **D**, 19 semanas, 40x, setas).

5.5.3 Ensaios de colocalização das proteínas Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 em glândulas salivares menores (IHC-P e IHC-IF)

A inervação autonômica foi evidenciada em todos os estágios e semanas do desenvolvimento estudados por meio de Tuj-1 em fibras e feixes nervosos mesenquimais das glândulas salivares menores estudadas (figura 5.24, setas).

O padrão de expressão das AQPs foi o mesmo para GM descritos anteriormente e não houve colocalização entre Tuj-1 e AQPs 1, 3 e 5 também neste tipo glandular.

Figura 5.24 - Exemplos dos resultados dos ensaios de dupla marcação entre AQPs 1, 3 e 5 e Tuj-1 nos diversos estágios do desenvolvimento de glândulas menores (GM)



Fonte: a autora.

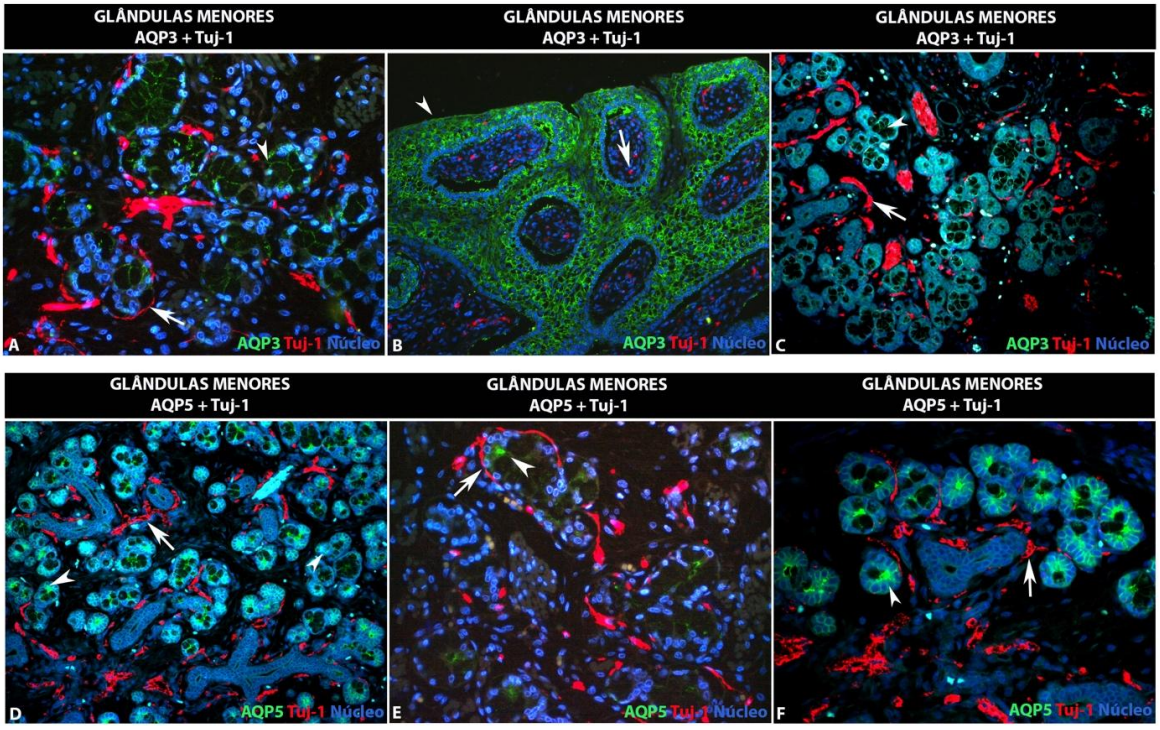
Estágio de botão inicial expressando Tuj-1 em feixes autonômicos (seta), 40X **(A)**; estágio pseudoglandular expressando AQP1 de forma difusa em botões acinares (ponta de seta), expressão de Tuj-1 em feixes nervosos autônomos (seta), espécime língua, 23 semanas aumento 20x **(B)**; estágio canalicular evidenciando expressão de AQP1 na microvasculatura (ponta de seta), expressão de Tuj-1 em feixe nervoso (seta) e fibras nervosas, 22 semanas, 40x **(C)**; estágio botão terminal expressando AQP1 em membranas acinares mucosas (ponta de seta), Tuj-1 expresso em feixe nervoso (seta), 40x **(D)**; estágio botão inicial, exibindo expressão de AQP3 nos queratinócitos em invaginação de mucosa lingual (ponta de seta), Tuj-1 expresso em fibras nervosas (seta) e feixes autonômicos, espécime x, 12 semanas, 20x **(E)**; estágio pseudoglandular evidenciando expressão citoplasmática e basolateral para AQP3 (ponta de seta), Tuj-1 expresso em feixe nervoso (seta) e fibras autonômicas, língua, 23 semanas, 40x **(F)**, estágio canalicular expressando AQP3 em citoplasma e membranas basolaterais acinares mucosas (ponta de seta), Tuj-1 expresso em fibras nervosas autônomas circundando e comunicando-se com estruturas ductais e acinares, espécime assoalho, 23 semanas, 40x **(G)**; estágio botão terminal evidenciando fraca ou nenhuma expressão de AQP3 em membranas basolaterais (ponta de seta) e feixes nervosos exibindo expressão de Tuj-1 (seta), espécime assoalho, 18 semanas, 40x **(H)**; estágio botão inicial com expressão intensa e difusa de AQP5 em formações pré-acinares (ponta de seta), Tuj-1 expresso em feixes e fibras nervosas autonômicas, língua, 23 semanas, 40x **(I)**; estágio pseudoglandular expressando AQP5 em

formações pré-ductais (ponta de seta) e ácinos de modo intenso, expressão de Tuj-1 em fibras nervosas mesenquimais (seta), espécime língua, 22 semanas, 40x **(J)**, estágio canalicular expressando AQP5 em formações pré-ductais (ponta de seta) e ácinos, expressão de Tuj-1 em fibras nervosas em comunicação direta com estruturas acinares (seta), espécime língua, 20 semanas, 40x **(K)**, estágio botão terminal evidenciando expressão citoplasmática de AQP5 porém, com especial intensidade em membranas apicais de ácinos mucosos (ponta de seta), espécime língua, 18 semanas, 40x **(L)**.

A expressão de Tuj-1 foi identificada de modo intenso em glândulas salivares menores também por meio de imunofluorescência em feixes e fibras nervosas autonômicas (figura 5.25, setas).

A expressão de AQP3 foi observada em membranas basolaterais acinares (figura 5.25A, ponta de seta) e queratinócitos de mucosa lingual revestindo papilas gustativas em formação (figura 5.25B, ponta de seta). Já a expressão de AQP5, assim como nos demais espécimes glandulares maiores e menores, foi expresso em membranas apicais acinares (figura 5.25D-F, ponta de seta).

Figura 5.25 - Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQPs 3 e 5 e Tuj-1 em glândulas salivares menores



Fonte: a autora.

Expressão de AQP3 em células basolaterais acinares (ponta de seta) expressão de Tuj-1 em fibras nervosas autonômicas enovelando botões acinares (seta) espécime língua, 12 semanas, aumento 40x **(A)**; expressão de AQP3 em queratinócitos de mucosa revestindo papilas linguais (ponta de seta) e expressão de Tuj-1 em pequenas fibras nervosas intra-papilares (seta), espécime língua, 12 semanas, 40x **(B)**; expressão de AQP3 em membranas basolaterais de células acinares (seta) e expressão de Tuj-1 ao redor de ductos (seta) e ácinos, espécime assoalho, 21 semanas, 20x **(C)**; expressão de AQP5 em lúmen apical acinar (ponta de seta) e expressão de Tuj-1 em fibras nervosas

mesenquimais (seta) ,espécime assoalho, 23 semanas, 20x **(D)**; expressão de AQP5 em lúmen apical acinar (ponta de seta) e expressão de Tuj-1 em fibras autonômicas enovelando ácinos (seta) e difundidas em todo o mesênquima, espécime língua, 12 semanas, 40x **(E)**; expressão de AQP5 no lúmen acinar (ponta de seta) e expressão de Tuj-1 em fibras nervosas autonômicas enovelando porções ductais (seta) e difusas no mesênquima, espécime assoalho, 23 semanas, 20x **(F).**

Os resultados obtidos através da análise de GPs humanas serão resumidos na tabela 5.1 e os resultados obtidos entre GSMs e GMs humanas serão resumidos na tabela 5.2.

Tabela 5.1 - Resultados gerais GPs considerando estágios em período de desenvolvimento mais avançado onde a expressão das proteínas ocorre de modo mais evidente em humanos

GPs estágios*	Estrutura	AQP1	AQP3	AQP5	CD34	AML	S100	Tuj-1
Botão inicial	Ácinos	+	+	++	-	-	-	-
	Formação ductal	-	-	-	-	-	-	-
	Células mioepiteliais	-	-	-	-	+	+	-
	Vasculatura	++	-	-	++	++	+	-
	Inervação	-	-	-	-	-	++	++
Pseudo-glandular	Ácinos	+	+++	+++	-	-	-	-
	Formação ductal	+	+	++	-	-	-	-
	Células mioepiteliais	-	-	-	-	++	++	-
	Vascultaura	++	-	-	+++	+++	++	-
	Inervação	-	-	-	-	-	++	++
Canalicular	Ácinos	+	+++	+++	-	-	-	-
	Ductos	+	+	+++		-	-	-
	Células mioepiteliais	+	-	-	-	++	++	-
	Vasculatura	+++	-	-	+++	+++	++	-
	Inervação	-	-	-	-	-	+++	+++
Botão Terminal	Ácinos	-	+++	+++	-	-	-	-
	Ductos	-	++	+++	-	-	-	-
	Células mioepiteliais	++	-	-	-	+++	+++	-
	Vasculatura	+++	-	-	+++	+++	++	-
	Inervação	-	-	-	-	-	+++	+++

Fonte: a autora.

Legenda: intensidade de expressão por imunofluorescência: fraco (+), moderado (++), intenso (+++), negativo (-). *Considerando os estágios em semanas de expressão mais evidentes.

Tabela 5.2 - Resultados gerais GSMs e GMs considerando estágios em período de desenvolvimento mais avançado onde a expressão das proteínas ocorre de modo mais evidente em humanos

GSM e GMs estágios*	Estrutura	AQP1	AQP3	AQP5	CD34	AML	S100	Tuj-1
Botão inicial	Ácinos	+	++	++	-	-	-	-
	Formação ductal	-	-	-	-	-	-	-
	Células mioepiteliais	-	-	-	-	+	+	
	Vasculatura	++	-	-	++	++	+	-
	Inervação	-	-	-	-	-	++	++
Pseudo-glandular	Ácinos	+	+++	+++	-	-	-	-
	Formação ductal	+	+	++	-	-	-	-
	Células mioepiteliais	-	-	-	-	+	+	-
	Vascultaura	++	-	-	+++	+++	++	-
	Inervação	-	-	-	-	-	+++	+++
Canalicular	Ácinos	+	+++	+++	-	-	-	-
	Ductos	+	+	+++		-	-	-
	Células mioepiteliais	++	-	-	-	++	++	-
	Vasculatura	+++	-	-	+++	+++	++	-
	Inervação	-	-	-	-	-	+++	+++
Botão Terminal	Ácinos	-	+++	+++	-	-	-	-
	Ductos	-	++	+++	-	-	-	-
	Células mioepiteliais	++	-	-	-	+++	+++	-
	Vasculatura	+++	-	-	+++	+++	++	-
	Inervação	-	-	-	-	-	+++	+++

Fonte: a autora

Legenda: intensidade de expressão por imunofluorescência: fraco (+), moderado (++), intenso (+++), negativo (-). *Considerando os estágios em semanas de expressão mais evidentes.

5.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA EXPRESSÃO DAS AQPS 1, 3 E 5 DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE GLÂNDULAS SALIVARES DE CAMUNDONGO

Devidas as discrepâncias do período gestacional em seres humanos (até 42 semanas) e modelo animal de camundongo (19-21 dias), o desenvolvimento das

glândulas salivares de camundongo se desenvolvem mais rapidamente e de forma mais sincronizada quando comparadas às glândulas salivares humanas. No entanto, glândulas salivares de camundongos foram recentemente comparadas à glândulas salivares humanas devido à sua similaridade anatômica e histológica (Maruyama et al., 2019).

A análise dos espécimes de modelos de embriões de camundongos CD1 nos permitiu observar que, após o início do desenvolvimento das glândulas salivares em modelo animal (11º dia intraútero), a morfologia estrutural glandular avança rapidamente atingindo diferentes estágios do desenvolvimento em um curto período de tempo. Após o primeiro dia do início de formação glandular, GSM evoluem dos estágios de botão inicial para demais estágios a cada 24 horas. Quando cultivadas em meio de cultivo DMEM, as glândulas salivares têm seus botões acinares proliferando de forma contínua, evoluindo morfologicamente em questão de horas.

Com isso, fez-se necessário avaliação precisa do dia inicial da coleta do embrião (13º dia), onde o fenótipo glandular alcançava o estágio pseudoglandular. Os resultados obtidos a partir de espécimes de camundongos CD1, além de ter sua morfologia descrita entre pseudoglandular a botão terminal, serão aqui identificadas também pelo dia exato do desenvolvimento. O **dia embrionário** será representado pela letra E (embrionário), onde estágio pseudoglandular representa o 13º dia embrionário (E13.5), estágio canalicular entre E14.5 e E15.5 e estágio de botão terminal que ocorre após o 16.5 dia embrionário.

Com isso, a análise de cultura organotípica das GSM e GSL dos embriões de camundongos CD1 revelou progressivo crescimento de lóbulos acinares durante o período de cultivo, partindo do estágio pseudoglandular em E13.5 até E16.5, onde a ramificação de ácinos e ductos demonstrou características estruturais de botão terminal.

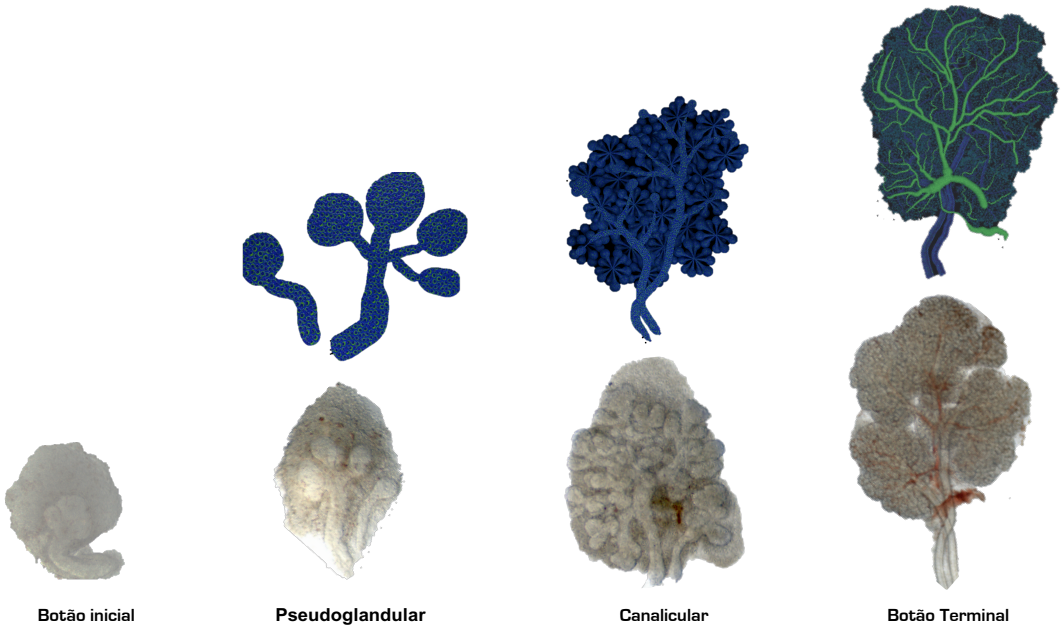
No momento da dissecção das glândulas salivares do embrião de camundongo CD1 em E13.5, foram realizadas as primeiras fotografias registrando-se a fase pseudoglandular. Após 24 horas, já no 14º dia de desenvolvimento glandular embrionário (E14.5) o segundo registro é feito identificando-se o tecido epitelial em estágio canalicular inicial e, assim, sucessivamente. Para se ter ideia do quão rápido é o desenvolvimento morfológico glandular em embriões de camundongos, caso se ultrapasse 24 horas do registro fotográfico anterior, é

possível que não seja mais possível identificar o estágio seguinte na ordem correta, já que a evolução das ramificações glandulares ocorre em poucas horas.

É importante salientar que, devido a esse acelerado avanço do desenvolvimento, conta-se “dia e meio” para identificação dos estágios (ex.: dia embrionário 14 e meio (E14.5)). Isso ocorre porque é inviável para o setor responsável pelo cruzamento dos camundongos identificar o horário exato em que a fecundação da camundonga ocorreu. Uma vez que em questão de horas o avanço da morfologia glandular ocorre neste modelo, considera-se meio (0.5) como “margem de erro” para identificação exata de cada estágio.

A figura 5.26 ilustra as fases do desenvolvimento embrionário de camundongos CD1 desde o início da formação glandular.

Figura 5.26 - Descrição dos estágios da morfogênese da GSM de embriões de camundongos.



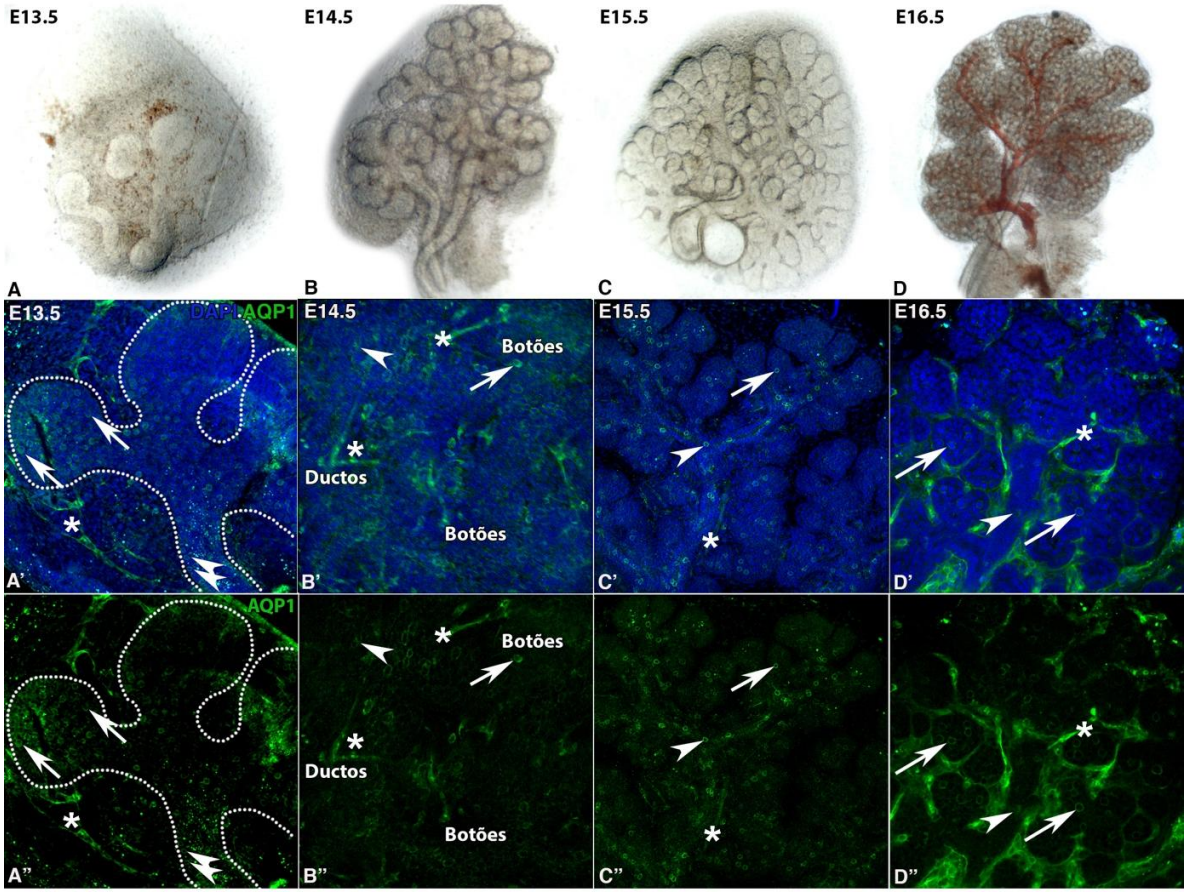
Fonte: a autora.

Em **E12.5**, quando já há um espessamento do epitélio de superfície, ocorre invaginação ao mesênquima subjacente formando um botão ligado à superfície oral por uma estrutura que, mais tarde, se tornará um ducto, sendo essa a fase de botão inicial. No dia embrionário **13.5**, 3 a 5 botões são formados no estágio pseudoglandular e entre os dias embrionários **14.5** e **15.5**, já no estágio canalicular, ocorre expansão de lúmen ductal e a formação de uma estrutura multilobulada, atingindo, então, o estágio incipiente de botão terminal em **E16.5**, onde estruturas ductais e acinares multi ramificadas iniciam o processo de consolidação de estrutura glandular funcional.

5.6.1 Análise morfológica da expressão de AQP1 em GSM e GSL de embriões de camundongos

Durante o todo o período de cultivo estudado, já a partir do estágio pseudoglandular (E13.5), a proteína AQP1 foi identificada por meio de análise de fluorescência em *whole mount* sendo expressa nas membranas basolaterais de diversas células componentes de estruturas de botões e ductos, além de estruturas vasculares do estroma glandular, o que ocorre também no início do estágio canalicular em E14.5 e em estágio canalicular tardio E15.5. Nesta fase, AQP1 assume um padrão de expressão melhor organizada e evidente nas membranas de células acinares e ductais, tornando-se robusta na microvasculatura do estágio de botão terminal em E16.5 (figura 5.27).

Figura 5.27 - Padrão de expressão de AQP1 durante o desenvolvimento da glândula submandibular de camundongo CD1



Fonte: a autora.

Cultivo de GSM representando morfologia de estágio pseudoglandular em E13.5 **(A)** evidenciando expressão de AQP1 nas membranas basolaterais de células componentes do parênquima acinar

(seta) e ductal (ponta de seta), também evidenciada no tecido endotelial (asterisco) e alguns células dispersas no estroma, 40x **(A'-A")**; representação morfológica de GSM em cultivo evidenciando estágio canalicular em E14.5 **(B)**, exibindo expressão de AQP1 em membranas basolaterais celulares (seta) e microvasculatura (asterisco), 40x **(B'-B")**, 40x; morfologia do estágio canalicular tardio E15.5 **(C)** exibindo expressão de AQP1 em membranas basolaterais em células de botões acinares (seta) e ductos (ponta de seta), também expressa em microvasculatura mesenquimal (asterisco), **(C'-C")**, 40x; estágio de botão terminal (E16.5) **(D)** expressando AQP1 de modo intenso em tecido endotelial bem estabelecido enovelando parênquima glandular (asterisco), além de membranas basolaterais celulares em botões epiteliais (seta) e ductos glandulares (ponta de seta), 40x, **(D'e D")**.

5.6.2 Análise morfológica da expressão das AQPs 1, 3 e 5 em GSM e GSL de embriões de camundongos

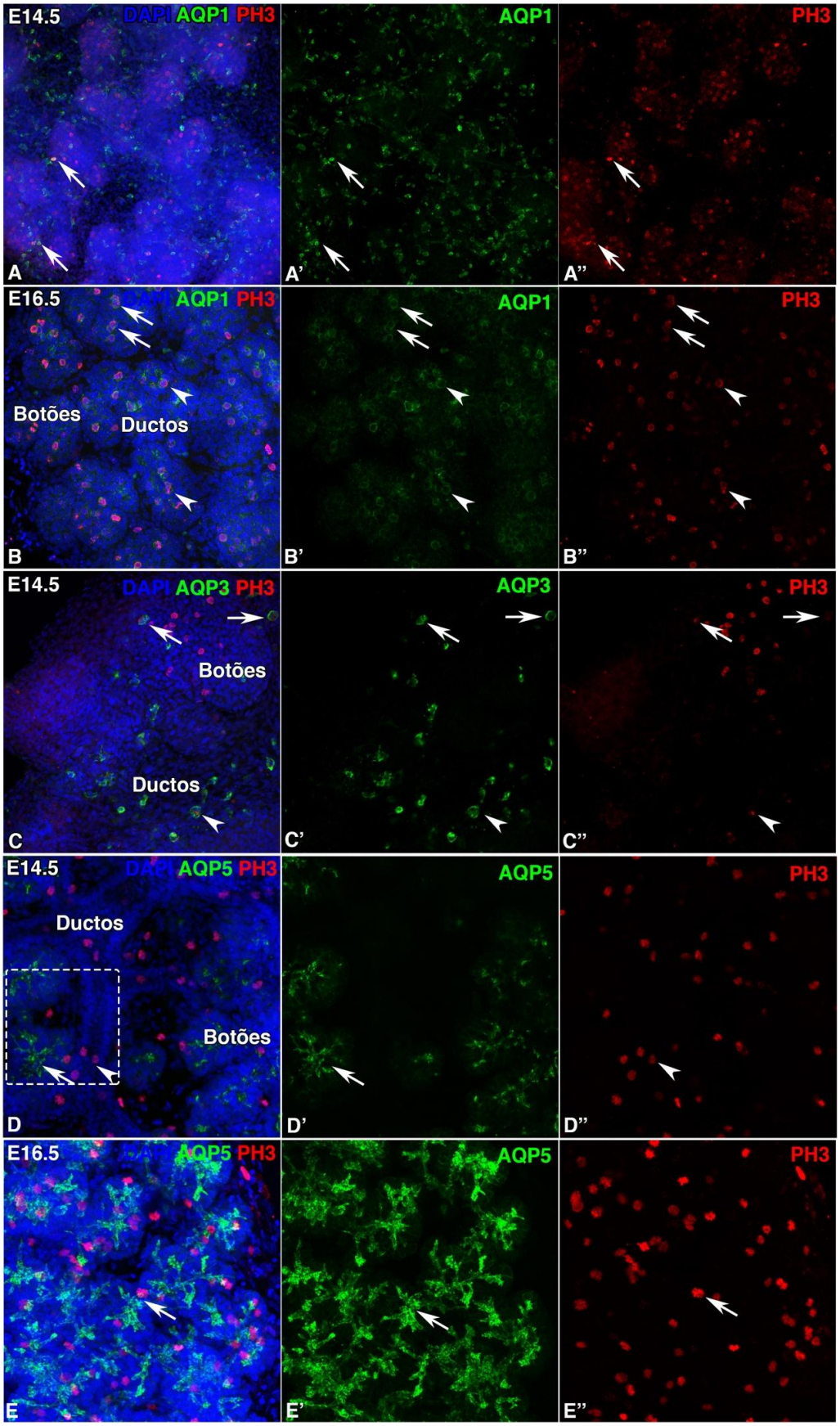
Em espécimes de embriões de camundongos, a expressão de AQP1 em GSM e GSL foi evidenciada em membranas basolaterais de células componentes de estruturas acinares e ductais com características fenotípicas de mitose ainda nos períodos mais iniciais do desenvolvimento analisados (pseudoglandular, E13.5).

Além de AQP1, a expressão da proteína AQP3 foi identificada em todos os períodos do desenvolvimento glandulares de embriões de camundongos analisados (E13.5 a E16.5), sendo evidenciada nas membranas basolaterais de células dispersas no mesênquima glandular e, ainda que de modo menos evidente, no parênquima das GSM e GSL. Além de AQP1, AQP3 parece estar expressa em células com núcleos característicos de mitose. Em dupla marcação com Phospho-Histone3 (PH3), uma proteína expressa em núcleos celulares em estágios iniciais de mitose, tanto AQP1 (figuras 5.28A-B''), quanto AQP3 (figuras 5.28C-C'') é evidenciada, majoritariamente, em células positivas para este marcador mitótico em diversas células estromais.

Além disso, a AQP3 exibe padrão de expressão positivo em estruturas com características de vasos sanguíneos no mesênquima glandular. No entanto, a análise em dupla marcação realizada por meio de AQP1 e CD31 nos permitiu identificar que embora tais estruturas se entrelacem, não houve colocalização dessas proteínas.

Ainda, embora AQP5 tenha papel central no transporte de saliva, durante o período mais incipiente de desenvolvimento glandular analisados neste estudo (E13.5) essa proteína não pôde ser identificada por meio de imunofluorescência confocal. Ao contrário das AQPs 1 e 3, AQP5 somente pôde ser identificada de modo pouco intenso a partir de E14.5 (figuras 5.28D, D'), sendo expressa nas membranas apicais acinares de modo constitutivo em E16.5 (figuras 5.28E, E').

Figura 5.28 - Padrão de expressão das AQPs 1, 3 e 5 em dupla marcação com PH3 em espécimes de GSM e GSL de embriões de camundongos CD1



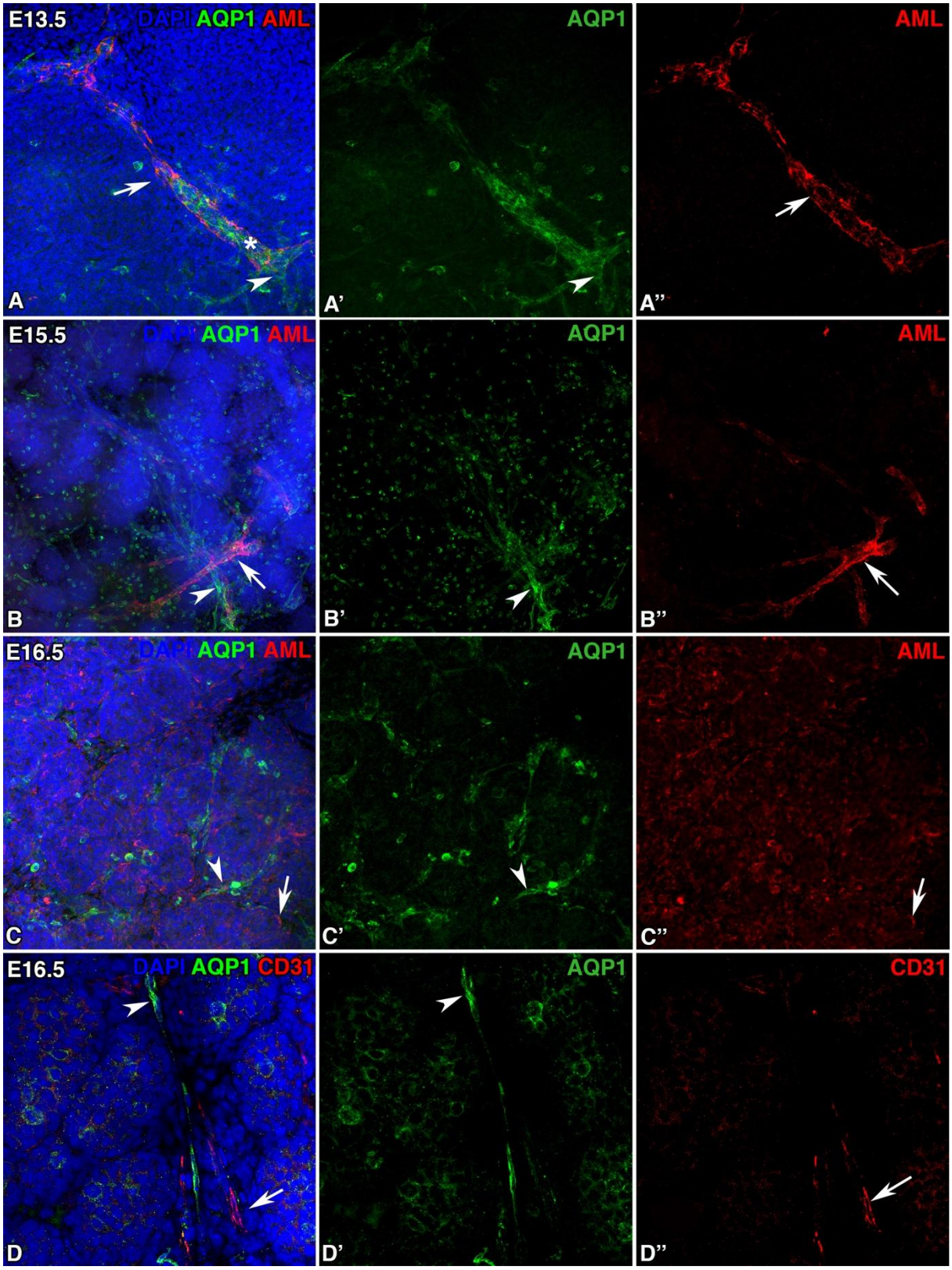
Fonte: a autora.

Expressão de AQP1 nas membranas basolaterais celulares em E14.5 e (**A e A'**, setas) exibindo expressão concomitante nas células em processo de mitose expressas por meio de PH3 também em botões acinares (**A** e **A''**, setas), 40x; expressão de AQP1 em membranas basolaterais de células acinares (**B** e **B'**, seta) e ductais (B e B', ponta de seta), evidenciando expressão de PH3 em células que positivas para AQP1 (**B** e **B''**), 63x; expressão de AQP3 em células evidenciando núcleos condensados caracterizando o processo de mitose dispersas em mesênquima, botões acinares e ductos (**C** e **C'**) e expressão de PH3 nas respectivas células evidenciados em **C** e **C''**, 40x; em E15.5 a expressão de AQP5 evidenciada em membranas apicais acinares (**D** e **D'**) e expressão de PH3 de modo independente, não evidenciado em porções especificamente em células que expressam AQP5 (**D** e **D''**), 63x; em E16.5, observa-se expressão apical intensa de AQP5 em botões acinares (**E** e **E'**) e expressão de PH3 em sítios distintos em **E** e **E''**, 63x.

Por meio de imunofluorescência confocal, espécimes submetidos à dupla marcação entre AQP1 e AML evidenciaram colocalização em sítios vasculares difundidos no mesênquima glandular já em E13.5 (figuras 5.29A-A''), apesar de AML ter mostrado sua expressão em sítios de parede vascular (figura 5.29A). Com o avanço do desenvolvimento, GSM em E15.5 exibe diferentes sítios de expressão para AQP1 e AML, colocalizaram-se somente em pequenos sítios vasculares (figura 5.29B). Mais tarde, em E16.5, o padrão de expressão para AML foi detectada em sítios de presumíveis células mioepiteliais em estruturas de botões acinares (figuras 5.29C, C"), enquanto AQP1 permaneceu expressa em diversas células epiteliais, bem como na microvasculatura (figuras 5.29C, C').

Por outro lado, análise de dupla marcação entre AQP1 e CD31 nos permitiu identificar expressão de ambas proteínas em diferentes sítios microvasculares. Não houve colocalização entre tais proteínas em todos os sítios endoteliais ao longo do tecido vascular. Tal coexpressão foi identificada apenas ocasionalmente. Além disso, por meio de dupla marcação entre AQP1 e CD31, a GSM de camundongos em E16.5 exibiu expressão de CD31 como marcador endotelial predominante (figuras 5.29D e D", seta), sendo a proteína de canal de água AQP1 evidenciada em capilares ou tecido vascular mais delicado (figuras 5.29D e D, ponta de seta).

Figura 5.29 – Exemplos dos resultados dos ensaios de imunofluorescência com dupla marcação entre AQP1 e AML e AQP1 e CD31 em espécimes de GSM e GSL de embriões de camundongos CD1



Fonte: a autora.

Em E13.5, GSM exibiu evidente expressão de AQP 1 em sítios vasculares mesenquimais (**A**, **A'**, ponta de seta) onde AML também exibiu intensa expressão colocalizando-se determinados sítios com AQP1 (**A**, asterisco) além de exibir evidente expressão endotelial nas paredes de vasos

sanguíneos (**A** e **A"**), 63x; em E15.5, evidencia-se expressão de AQP1 (**B** e **B'**, ponta de seta) e AML (**B** e **B**, seta) sobrepondo, mas não colocalizando sítios vasculares, exibindo expressão em diferentes sítios vasculares para AQP1 e AML **(B)**, 40x; em E16.5, no estágio de botão terminal, é evidenciada a expressão de AQP1 nas estruturas endoteliais (ponta de seta **C** e **C'**), enquanto a expressão de AML se torna mais evidentemente organizada em torno de membranas epiteliais confinando-se em presumíveis células mioepiteliais (**C** e **C"**, setas), 40x; expressão de AQP1 evidenciada em microvasculatura por meio de AQP1 (D E D'), também expressa em membranas basolaterais de células do epitélio acinar (verde), e CD31 evidenciando expressão em diferentes sítios vasculares, enovelando o parênquima glandular (**D** e **D"**, seta)**,** 63x.

A tabela 5.3 resume os resultados obtidos em GSMs de camundongos e a tabela 5.4 compara os resultados obtidos em GSMs humanas e de camundongos.

Tabela 5.3 - Sumário de resultados obtidos em GSMs de camundongos

Estágio	**Aspectos morfológico GSM**	**Estrutura**	**AQP1**	**AQP3**	**AQP5**	**PH3**	**CD31**	**AML**
Pseudo glandular E13.5	Morfogênese de formação inicialcom aproximadamente 4-5 botões	Ácinos	++	+	-	+	0	-
		Formação ductal	++	+	-	+	0	-
		Vasculatura	+	+	-	+	0	+++
		Células mioepiteliais	-	-	-	-	0	-
Canalicular E14.5 - E15.5	Proliferação celular do parênquima. Glândula multilobulada e abertura do lúmen ductal	Ácinos	++	+	++	++	0	-
		Ductos	++	+	+	++	0	-
		Vasculatura	++	-	-	++	0	+++
		Células mioepiteliais	+	-	-	-	0	++
Botão Terminal >E16.5	Ramos e botões terminais formam ácinos e ductos bem estruturados desenvolvidos	Ácinos	++	++	+++	+++	-	-
		Ductos	++	+	++	+++	-	-
		Vasculatura	+++	-	-	-	+++	+++
		Células mioepiteliais	++	-	-	-	-	+++

Fonte: a autora

Legenda: intensidade de expressão por imunofluorescência: fraco (+), moderado (++), intenso (+++), negativo (-), não testado (0).

Tabela 5.4 - Comparação dos resultados obtidos em glândulas submandibulares humanas e de camundongos em desenvolvimento

*Estágio GSM	Estrutura	AQP1 GSMs humanas	AQP1 GSMs camundongos	AQP3 GSMs humanas	AQP3 GSMs camundongos	AQP5 GSMs humanas	AQP5 GSMs camundongos	AML GSMs humanas	AML GSMs camundongos
Pseudo-glandular	Ácinos	+	++	+	+	++	-	-	-
	Formação ductal	+	++	+	+	+	-	-	-
	Vasculatura	++	+	-	**+	-	-	++	+++
	Células mioepiteliais	-	-	-	-	-	-	-	-
Canalicular	Ácinos	+	++	+	+	+++	++	-	-
	Ductos	+	++	+	+	+	+	-	-
	Vasculatura	++	++	-	-	-	-	+++	+++
	Células mioepiteliais	+	+	-	-	-	-	++	++
Botão Terminal	Ácinos	-	++	++	++	+++	+++	-	-
	Ductos	-	++	+	+	++	++	-	-
	Vasculatura	++	+++	-	-	-	-	+++	+++
	Células mioepiteliais	+	++	-	-	-	-	+++	+++

Fonte: a autora.

Legenda: intensidade de expressão por imunofluorescência: fraco (+), moderado (++), intenso (+++), negativo (-), não testado (0).
*Considerando estágios mais iniciais do desenvolvimento em semanas das GSMs de humanos. **Estruturas com características vasculares

6 DISCUSSÃO

Os estágios do desenvolvimento das glândulas salivares descritos em modelo de animal (Jaskoll; Melnick, 1999; Tucker, 2007) possuem características histológicas intimamente relacionados às fases do desenvolvimento glandular humano (Maruyama et al., 2019). Com isso, é fundamentada a análise, comparação e discussão de resultados obtidos a partir de modelos glandulares humanos e de embriões de camundongo avaliados neste estudo, com achados descritos na literatura em diferentes modelos animais e glândulas salivares humanas em desenvolvimento ou totalmente desenvolvidas. A análise das aquaporinas, células mioepiteliais, vasculatura e inervação em espécimes humanos em período inicial de maturação são escassos na literatura. Visando contribuir com o avanço do conhecimento acerca do desenvolvimento das glândulas salivares, nossos resultados adicionam informações da fisiologia básica que poderão subsidiar pesquisas para novas estratégias terapêuticas para pacientes com xerostomia ou tecnologias que possibilitem na prevenção da hipofunção glandular.

Embora o surgimento de rudimentos das glândulas salivares humanas seja ainda controverso na literatura, uma vez que Porcheri e Mitsiadis (2019) citam o início deste processo na 4ª semana de vida intrauterina, Ellis e Auclair (2008) indiquem o período inicial ao final da 5ª semana e Togni et al. (2019) indiquem que somente na 6ª semana da embriogênese o início do desenvolvimento glandular humano ocorra, pudemos observar com este estudo que espécimes de glândula parótida identificados com 4 semanas de vida intra-uterina exibem estruturas com características glandulares em estágio de botão inicial e pseudoglandular.

Ellis e Auclair (2008) descrevem ainda, que a GSM inicia sua formação ao final da 6ª semana. Histologicamente, no entanto, observamos que a GSM assume um padrão de maturação mais desenvolvido que GP quando comparado o mesmo período de maturação em semanas, apoiados em evidências acinares e ductais características de estágios pseudoglandular, canalicular e botão terminal identificados com maior frequência na GSM, além do aspecto celular que compõem cada fase,

evidenciando uma arquitetura epitelial mais robusta e melhor estabelecida morfologicamente (células acinares mais abertas).

Além disso, glândulas salivares menores, preditas como o último tipo glandular a se desenvolver (a partir do 3º mês de vida intrauterina) (Ellis; Auclair, 2008), são identificadas nos diversos sítios da cavidade oral neste estudo, evidenciando, ainda na 12ª semana gestacional, ácinos e ductos já em fase avançada do desenvolvimento, indicando que o surgimento das glândulas menores possa ocorrer antes do período descrito por alguns autores ou que este ocorra de maneira incomparavelmente mais ágil que as glândulas salivares maiores.

Uma das hipóteses para tais achados é que a evolução no desenvolvimento das células acinares serosas (GP), mistas (serosas e mucosas na GSM) e mucosas das glândulas GMs ocorra em etapas diferentes. A GP humana é o primeiro tipo glandular a iniciar seu desenvolvimento e possui ácinos puramente serosos, no entanto, até a 24ª semana gestacional, este tipo glandular exibe os estágios botão inicial e pseudoglandular de forma frequente e predominante quando comparada às glândulas submandibulares e, principalmente, glândulas salivares menores, sugerindo que células acinares serosas se desenvolvam de forma mais lenta que células acinares mucosas.

A segunda hipótese é que o desenvolvimento acelerado da GSM quando comparado à GP e das glândulas menores, quando comparado às glândulas maiores, ocorra justamente devido às características morfológicas e anatômicas de cada tipo glandular. A GP possui a maior arquitetura estrutural, o que pode exigir um aparato acinar e ductal mais elaborado e complexo em comparação com glândulas submandibulares e menores. As glândulas menores são constituídas de pequenas porções epiteliais e exibem uma arquitetura glandular muito menos complexa que as glândulas maiores, o que permitiria facilidades acerca de seu processo de ramificação celular durante o desenvolvimento favorecendo sua rápida evolução.

A terceira hipótese está relacionada ao período inicial de formação das glândulas salivares menores humanas, que ocorreria anteriormente ao 3º mês de vida intrauterina, como citado por alguns autores.

Ainda, apesar de a literatura descrever o início do desenvolvimento das glândulas parótidas a partir da 5ª (Ellis; Auclair, 2008) ou indique que esta ocorra na

6ª (Togni et al., 2019) semana de vida embrionária em humanos, pudemos observar em espécime de GP identificado com 4 semanas, resquícios glandulares com características fenotípicas dos estágios botão inicial e pseudoglandular. Tais achados corroboram dados descritos por Nanci (2008), que relata rudimentos parotídeos entre a 4ª e 6ª semana de vida embrionária.

Assim, essa pesquisa adiciona novas e importantes informações acerca do início do desenvolvimento das glândulas salivares, mostrando que sua complexa estrutura inicia o seu desenvolvimento precocemente e necessita muitas etapas ao longo do período gestacional para completar a maturação que comporte seu funcionamento adequado no período pós-natal.

King et al. (1997), sugeriram que a análise dos sítios específicos de expressão celulares e subcelulares das AQPs poderiam elucidar as funções dos canais de água no epitélio glandular (King et al., 1997). Apesar dos diversos achados acerca do tema estarem hoje disponíveis na literatura mais de 20 anos depois, o papel das AQPs, principalmente durante o período de desenvolvimento glandular, ainda não está totalmente elucidado.

Durante as etapas do desenvolvimento glandular, as proteínas de canais de água AQPs 1, 3 e 5 foram expressas em diferentes intensidades dependendo do período de maturação glandular em semanas gestacionais. Tais moléculas foram previamente descritas em glândulas salivares de modelos de roedores durante a embriogênese (Akamatsu et al., 2003; Larsen et al., 2009) e em humanos durante o desenvolvimento (de Paula et al., 2017b). Ainda, a regulação endotelial é necessária ao desenvolvimento de estruturas epiteliais normais (Kwon et al., 2017) sendo o fluxo sanguíneo e o processo de secreção salivar amplamente controlado pela inervação autonômica (Proctor; Carpenter, 2007). Com base na importante integração desta rede de proteínas de canais de água, células mioepiteliais, vascularização e inervação tanto no processo de desenvolvimento quanto no funcionamento de glândulas desenvolvidas, este estudo discutirá possíveis correlações proteicas que os represente durante o desenvolvimento de glândulas salivares maiores e menores humanas.

A AQP1 é um canal de água expresso durante o desenvolvimento de glândulas salivares em modelo animal (Akamatsu et al., 2003; Larsen et al., 2009) e humanos (de Paula et al., 2017b). Neste trabalho, foi possível observar a expressão de AQP1

no parênquima glandular já no período mais incipiente do desenvolvimento tanto em glândulas salivares maiores, quanto em glândulas salivares menores humanas. Tais achados diferem, no entanto, daqueles descritos por Akamatsu et al (2003), que observaram a partir da GSM de embriões de ratos, imunoexpressão de AQP1 em capilares e vasos sanguíneos, mas não em células acinares e ductais (Akamatsu et al., 2003). Este mesmo estudo também é contrário a nossos achados em camundongos, onde a expressão de AQP1 pôde ser observada em membranas basais de ácinos e ductos intercalares, além das estruturas microvasculares já a partir de E13.5 por meio de imunofluorescência confocal por *whole mount* , enquanto Akamatsu et al. (2003) identificaram a expressão de AQP1 na vasculatura de GSM de embriões de ratos somente a partir de E18 utilizando a técnica de imunoistoquímica.

Por outro lado, corroborando nossos achados em GSM de camundongos, Larsen et al. (2009) detectaram AQP1 já em E13.5. Tais resultados, no entanto, foram obtidos por meio da técnica de RT-PCR, não evidenciando os sítios de expressão no parênquima glandular, impedindo a comparação histológica de expressão da proteína.

As diferenças entre estes resultados podem ter ocorrido devido às diferentes espécies analisadas ou mesmo pelos métodos utilizados. AQP-1 parece ser necessário para a formação de ácinos e expansão da canalização ductal, período no qual é necessária uma mudança intensa de fluido para formar um parênquima funcional e obter uma arquitetura bem formada. Posteriormente nas glândulas adultas, o AQP1 pode assumir papéis diferentes na fisiologia glandular, uma vez que, até onde sabemos, sua expressão não foi descrita, em botões acinares ou tecido ductal das glândulas adultas.

Embora AQP1 não tenha sido identificada em fibras e feixes nervosos de glândulas salivares humanas e de camundongos em desenvolvimento, Gao et al. (2006) detectaram a expressão desta proteína em células da glia do sistema nervoso periférico humano, em órgãos como pâncreas e esôfago, sugerindo que AQP1 possa estar envolvida na atividade nervosa periférica, operando como mediador do transporte de água em feixes e plexos nervosos, exercendo um mecanismo homeostático nestes tipos celulares.

Ainda, Aure et al. (2014) identificaram em GSMs e GSLs totalmente desenvolvidas de camundongos um padrão de expressão vascular para AQP1 muito semelhante aos nossos achados em glândulas salivares maiores e menores de

humanos em desenvolvimento e em GSM e GSL de embriões de camundongos, onde células endoteliais de vasos sanguíneos e capilares expressando AQP1 de modo intenso acompanham e enovelam ácinos e ductos, exibindo fraca ou nenhuma expressão em arteríolas. Em nosso estudo, tais estruturas somente exibiram expressão para AML e S100. Em espécimes de camundongos onde imagens foram obtidas por meio de microscopia confocal, a expressão de AQP1 em vasos sanguíneos foi identificada mais intenso na última fase avaliada (E16.5).

Esses resultados sugerem que AQP1 exerça importante função nos processos biológicos básicos requeridos no início da formação glandular, evidenciando sua participação ativa justamente nos estágios mais incipientes, período em que a troca ativa entre substratos oriundos de vasos sanguíneos são necessários à evolução e maturação da arquitetura glandular.

A expressão de AQP1 é também descrita em células mioepiteliais e endotélio de glândulas salivares humanas totalmente desenvolvidas (Gresz et al., 2001; Beroukas et al., 2002) e em gândulas salivares de camundongos adultos (Nakamura et al., 2013). Tais evidências se assemelham parcialmente aos nossos achados em glândulas salivares humanas, uma vez que, nos estágios mais avançados do desenvolvimento glandular (estágio de botão terminal) bem como em todos os estágios de glândula salivar no último período de maturação analisado (24 semanas), AQP1 assumiu um padrão de expressão exclusivo nas células mioepiteliais que enovelam porções de ducto intercalar e na microvasculatura glandular, não sendo mais identificada na maioria das células acinares ou estruturas ductais em estágio de botão terminal analisadas; essa proteína também mostrou colocalização com AML e S100 em diversos sítios endoteliais e células mioepiteliais, o que demonstra um provável papel suplementar na interação com a vasculatura e no controle da passagem de fluidos e outras moléculas requeridos tanto na evolução da arquitetura epitelial quanto na formação do fluido salivar, uma vez que é bem estabelecido que a saliva é produto de um ultrafiltrado do plasma sanguíneo. Essa colocalização e o estabelecimento da participação do AQP1 nas principais estruturas glandulares apresentadas em nossos resultados traz novos dados sobre o status e a importância dos AQPs para a biologia das glândulas salivares.

Ainda, nas GSM e GSL de camundongos, observamos a expressão de AQP1 nas membranas basolaterais de células acinares e ductais compatíveis com

processos proliferativos. Após confirmada a expressão transmembrânica de AQP1 majoritariamente em células que estavam em processo de divisão por meio de PH3, uma proteína que identifica ciclos iniciais de divisão celular, pudemos associar a expressão de AQP1 a processos mitóticos, ocorrendo de forma constitutiva durante a morfogênese de ramificação de camundongos entre E13.5 e E16.5. Apesar de o papel fisiológico da expressão de AQP1 em células proliferativas ser ainda controverso, uma vez que esta foi descrita como uma proteína envolvida na migração, metástases de tumores de camundongos, mas não na proliferação celular (Hu; Verkman, 2006), mais recentemente, a superexpressão de AQP 1 foi relacionada a processos de divisão, por serem canais de água capazes de alterar ciclinas, proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular (Galán-Cobo et al., 2016). Além disso, o nível de mRNA de proteínas AQP1 se altera durante processos proliferativos, exibindo menor expressão celular durante as fases S e G2 / M e se mostrando de modo mais intenso em G0 / G1 (Delporte et al., 1996), evidenciando um caráter celular peculiar em que, durante a morfogênese, AQP1 possa atuar como moderador proliferativo, facilitando a mitose necessária à maturação glandular.

Além de AQP1, Galán-Cobo et al. (2015) associaram a superexpressão de AQP3 com ciclinas envolvidas na progressão do ciclo celular. Somando este fato às evidências de núcleos celulares exibindo características de mitose desde os estágios E13.5 no mesênquima de GSM e GSL em nossos experimentos em camundongos, realizamos dupla marcação entre AQP3 e PH3, confirmando expressão majoritária de AQP3 nas membranas basolaterais de células positivas para PH3, o que confirmou nossa hipótese de que, além de AQP1, AQP3 também é expressa principalmente em células que estão em processo de proliferação, sugerindo que esta proteína facilite o transporte e trocas necessárias ao processo proliferativo de mesênquima, o qual exerce papel crucial no desenvolvimento epitelial glandular.

Corroborando nossos achados em glândulas salivares humanas, AQP3 foi detectada em glândulas submandibulares humanas em desenvolvimento (Wang et al., 2003). Tais resultados, porém, foram identificados por meio de RT-PCR, técnica de biologia molecular onde não é possível comparar os sítios de expressão para AQP3. Em glândulas salivares adultas, por sua vez, a expressão de AQP3 foi identificada nas membranas basolaterais de ácinos serosos e mucosos (Gresz et al., 2001; Beroukas

et al., 2002), mesmos sítios onde observamos expressão deste canal de água no parênquima glandular em desenvolvimento.

Glândulas submandibulares de embriões de ratos tiveram AQP3 detectado por meio de RT-PCR em baixo nível sugerindo que esta molécula poderia atuar de modo restrito somente em pequenos sítios de células especiais ou que, durante o desenvolvimento, esta proteína seria expressa de modo ínfimo nas glândulas salivares analisadas (Akamatsu et al., 2003). Em nosso entendimento e de acordo com nossos resultados obtidos em camundongos, portanto, comparando-se somente espécimes de roedores neste caso, as duas hipóteses estão corretas, uma vez que em nossos espécimes de camundongos, células distribuídas pelo mesênquima que expressam AQP3 apresentam associação com processos proliferativos, e portanto, não representavam grande população positiva especialmente em E16.5, quando AQP3 pôde ser observada de modo efetivo em queratinócitos da mucosa oral.

Nas glândulas salivares humanas, no entanto, a expressão de AQP3 na fase mais madura do desenvolvimento analisada (24 semanas) demostrou intensa expressão desta proteína em citoplasma e membranas basolaterais de células componentes de ácinos e ductos. Por outro lado, além de observada em membranas basolaterais e citoplasma de células acinares e ductais, a expressão de AQP3 foi também identificada em glândulas salivares de camundongos adultos (Nakamura et al., 2013). Tais diferenças de expressão nos diferentes espécimes e períodos de maturação poderiam sugerir distintas funções para AQP3 em glândulas salivares de roedores e humanos durante o desenvolvimento e em glândulas totalmente formadas.

Experimentos realizados com GSM e GSL de embriões de camundongos nos permitiram identificar que, além de expressa em todos os estágios analisados (E13.5 - E16.5) e expressa nas membranas basolaterais celulares distribuídas pelo mesênquima, AQP3 foi identificada particularmente em estruturas mesenquimais que, em um primeiro momento, foram identificados como vasos sanguíneos devido às suas características histológicas. No entanto, experimentos analisando dupla marcação entre CD31 e AQP3 nos permitiram identificar que não há nenhum tipo de colocalização entre as duas proteínas, embora distintos vasos se encontrem aleatoriamente no estroma.

Baseados no fato de que as glândulas salivares possuem uma atuante rede de vasos linfáticos, os quais têm importante função no transporte de lipídeos (Breslin et

al., 2018) participando da regulação e equilíbrio de fluidos intersticiais (Dongaonkar et al., 2009) e que, entre outros substratos, o fluido linfático é composto também por glicerol (Null; Agarwal, 2019), uma molécula que tem seu transporte facilitado por AQP3 (Hara-chikuma; Verkman, 2005), sugerimos que vasos linfáticos permeando o mesênquima glandular expressem AQP3 durante o desenvolvimento glandular de camundongos por favorecer o transporte de glicerol, importante componente lipídico. Em espécimes precoces de porcos, foi sugerido que a participação de lipídios desempenhe função na manutenção e estabelecimento celular auxiliando o desenvolvimento (Zhang et al., 2018).

Ainda, AQP3 regula o transporte de glicerol na proliferação de queratinócitos e no fluxo de água no processo de migração deste tipo celular. A diferenciação celular de queratinócitos também sofre, portanto, influência de AQP3 (Hara-chikuma et al., 2009). Tais dados explicam resultados observados neste trabalho, onde a intensa expressão de AQP3 foi identificada na mucosa oral em todos os espécimes onde este tecido se fez presente. Sendo a mucosa oral considerada uma extensão da pele, um órgão constituído também por queratinócitos e identificados desde os estágios mais iniciais do desenvolvimento tanto em humanos quanto em camundongos, houve expressão de AQP3 de modo intenso e evidente em ambos espécimes independentemente do estágio de maturação analisados.

Assim como AQP1, AQP3 é expressa em eritrócitos humanos, porém em escala muito menor (Rodriguez et al., 2019). Não houve colocalização entre AQP3 e qualquer proteína que exiba expressão eritrocitária, vascular, mioepitelial ou nervosa das glândulas salivares maiores ou menores utilizadas nesse estudo, embora Wakayama et al (2002), tenham identificado a expressão de AQP3 na membrana plasmática de músculos esqueléticos.

A expressão de AQP5 em glândulas salivares maduras de diversos modelos de mamíferos é amplamente relatada na literatura (Ma et al., 1999; Matsuzaki et al., 1999; Krane et al., 2001; Delporte; Steinfeld, 2006). Com isso, a expressão de AQP5 em lúmen ductal intralobular foi observada em porções específicas durante o desenvolvimento de SG de camundongo (Larsen et al., 2011) e glândulas salivares humanas (de Paula et al., 2017b). Corroborando nossos estudos em GSM e GSL de embriões de camundongos, onde a proteína AQP5 foi identificada em diversas porções intraductais, mais especificamente em E16.5. Em humanos, membrana apical

e lumens intraductais expressam AQP5 em diversos espécimes de glândulas salivares maiores e menores em diversos períodos de maturação.

Apesar de ser descrita como a AQP que exerce papel central nas glândulas salivares, a AQP5 não foi identificada desde o estágio mais incipiente nas GSMs e GSLs de embrões de camundongos analisadas (estágio pseudoglandular, E13.5), atuando de modo oposto às AQPs 1 e 3 que puderam ser observadas já nesta fase inicial. Somente em E14.5, na fase considerada pré-canalicular, AQP5 pôde ser identificada evidenciando aumento de expressão constitutiva com o avanço da maturação. Esses achados estão de acordo com resultados obtidos por Aure et al (2011), em que GSL de camundongos evidenciaram positividade da proteína AQP5 somente a partir do estágio canalicular, onde a expressão citoplasmática difusa desta proteína foi reproduzida em nossas análises, assumindo padrão de expressão majoritário em membranas apicais acinares, bem como expressão luminal em ductos intralobulares.

Já a análise da expressão de AQP5 em GSM de embriões de ratos foi identificada em níveis baixos, onde a primeira detecção do mRNA desta proteína ocorreu em E16. No entanto, a expressão de proteína por meio de imunoistoquímica pôde ser identificada somente em E18 nas membranas apicais acinares, capilares e vasos sanguíneos sugerindo que, além de AQP1, AQP5 possa auxiliar o processo de desenvolvimento do tecido glandular com água e eletrólitos responsáveis pela origem da saliva e evidenciando barreiras endoteliais envolvidas no transporte de água (Akamatsu et al., 2003). Em nossos achados, no entanto, não houve expressão vascular de AQP5 em nenhum tipo glandular ou período de maturação.

No estágio terminal do botão, AQP5 foi identificada em membrana apical de ductos intralobulares (Aure et al., 2011). Também em camundongos, GSL e GSM exibem expressão de AQP5 de maneira dispersa e semelhante nos túbulos terminais do estágio canalicular (Aure et al., 2011; Larsen et al., 2011). Em seres humanos, a expressão de AQP5 em glândulas salivares totalmente desenvolvidas é identificada nas membranas apicais de células acinares (Gresz et al., 2001; Beroukas et al., 2002), estando esses achados de acordo com nossos resultados em glândulas salivares humanas durante o desenvolvimento onde o mesmo padrão de expressão foi evidenciado, o que sugere papel similar de AQP5 tanto em processos de maturação, quanto em glândulas salivares maduras.

Ainda, Matsuzaki et al (2012) identificaram a expressão de AQP5 não somente nas membranas apicas acinares, como em membranas laterais das celulas acinares glandulares de camundongos, corroborando nossos achados em diversos espécimes e estágios do desenvolvimento onde foi possível identificar intensa expressão desta proteína também nas membranas laterais acinares de glândulas salivares maiores e menores humanas em desenvolvimento.

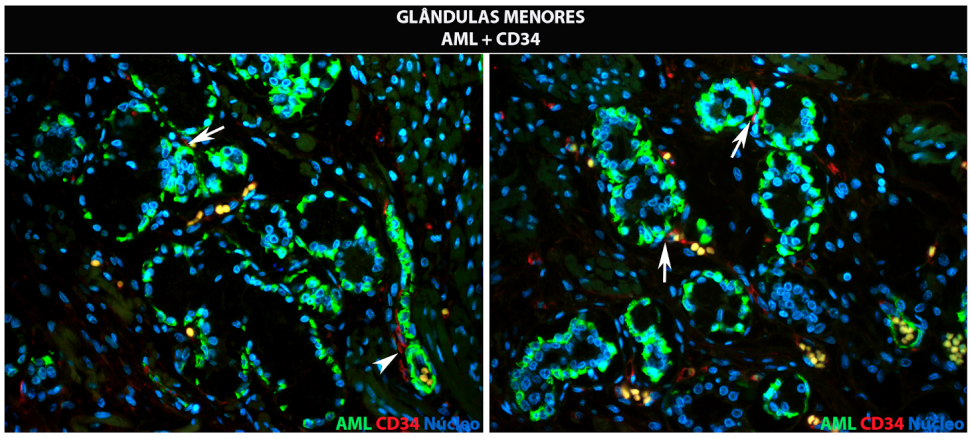
Em glândulas salivares de camundongos adultos, AQP5 foi evidenciado nas membranas apicais e basolaterais de células componentes de GPs e GSMs, mas não em glândulas sublinguais (Nakamura et al., 2013). Em nossa pesquisa, porém, tanto GSMs quanto GSLs de embriões de camundongos evidenciaram um padrão de expressão muito similar para AQP5 em ambos os tipos glandulares analisados.

Sabe-se que a irrigação sanguínea é crítica ao período inicial do desenvolvimento de diversos órgãos, auxiliando na coordenação do processo de maturação (Magenheim et al., 2011). Assim, Togarrati et al. (2017) identificaram a expressão de CD34 em glândulas submandibulares humanas entre a 16ª e 24ª semana de desenvolvimento de modo mais intenso quando comparado à glândulas totalmente desenvolvidas. Em nosso trabalho, não houve avaliação do padrão de expressão vascular em glândulas adultas, no entanto, pudemos identificar desde o período mais incipiente do desenvolvimento glandular (4 semanas), a existência de uma rede de capilares e vasos sanguíneos intrincada e extensa enovelando o parênquima e permeando o mesênquima glandular em formação expressa por meio de CD34, o que indica o surgimento de ampla neoangiogênese atuando em resposta à necessidade de fornecimento de subsídios requeridos no processo de síntese e maturação glandular.

Por meio de imunoistoquímica, receptores de endotelinas foram identificados não somente na microvasculatura de glândulas submandibulares de ratos, como em torno de ácinos e ductos excretores os quais foram descritos como sítios compatíveis com a posição das células mioepiteliais (Ventimiglia et al., 2011). Sendo endotelinas componentes de vasos sanguíneos e capilares, estruturas identificadas em nosso trabalho por meio de CD34 em dupla marcação com AML, exibiram padrão de expressão compatível com o descrito por Ventimiglia et al. (2011), onde observamos estruturas de microvasculatura comunicando-se com botões epiteliais em formação, ligadas em sítios que expressam AML (figura 6.1, setas).

Além disso, a expressão de CD34 em vasos sanguíneos e capilares esteve intimamente relacionada à expressão de AML nessas estruturas (figura 6.1, ponta de seta). Apesar disso, não podemos afirmar de forma cabal que endotelinas estejam diretamente correlacionadas à função mioepitelial e vascular, uma vez que, durante o período de maturação analisados neste estudo, as células mioepiteliais ainda não estão totalmente desenvolvidas e, marcadores específicos de endotelinas não foram utilizados neste estudo, onde CD34 possui características de expressão mais amplas que endotelinas no tecido vascular, o que poderia impossibilitar a identificação de comunicação em sítios tão específicos.

Figura 6.1 - Expressão de AML (verde) e CD34 (vermelho) em glândula salivar menor, espécime de língua, 12 semanas, aumento 40x



Fonte: a autora

Outro dado interessante neste mesmo trabalho sugere que GSM de ratos possuam um mecanismo ao qual denominaram “endotelinérgico”, que seria a regulação de sinapses noradrenérgicas realizadas por endotelinas, baseados em sua capacidade de auxiliar na regulação periférica e central dos estímulos de secreção salivar (Ventimiglia et al., 2011). Tal conceito é absolutamente pertinente, uma vez que ao longo de nosso trabalho identificamos que a microvasculatura pode estar intimamente associada à estruturas de fibras e feixes nervosos identificados por meio de S100 e Tuj-1, atuando também de forma quase que subjacente em diversos sítios do epitélio glandular em maturação, além de apoiados no fato de que experimentos realizados por Kwon et al. (2017), identificaram que a inibição da vasculatura embrionária é capaz de impactar negativamente não só no número de botões acinares

e em sua diferenciação, como no tamanho das estruturas ductais em desenvolvimento.

Além disso, um importante estudo publicado por Makita et al. (2008) identificou endotelinas vasculares atuando como auxiliar em um mecanismo coordenador de crescimento e orientação axonais da inervação autonômica, incluindo em estruturas glandulares. A morfologia de estruturas vasculares e nervosas foram observadas em nosso estudo atuando de forma adjacente em diversos espécimes glandulares maiores e menores, o que poderia embasar evidências encontradas por Makita et al. (2008), projetando a maturação glandular por meio da comunicação entre epitélio, vasculatura e inervação.

As interações recíprocas entre a vasculatura em desenvolvimento e o epitélio provavelmente ocorrem por diversos aspectos de modo análogo à ramificação glandular (Kwon et al., 2017). Além da microvasculatura, a inervação parece atuar como importantes guias na formação precoce das glândulas salivares, preservando o potencial das células-tronco e auxiliando no transporte de nutrientes necessários para o crescimento do tecido até que adquiram arquitetura estrutural funcional, uma vez que tanto a inibição de vasos sanguíneos e capilares (Kwon et al., 2017), quanto da inervação (Knox et al., 2010, 2013) ocasionam o desenvolvimento de estruturas glandulares defeituosas.

O sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, desempenha função crucial na regulação da contratilidade e processo de tensão de estruturas da parede vascular (Sheng; Zhu, 2018). Com isso, é plausível que a expressão de marcadores vasculares nas glândulas salivares atue de forma paralela com AML no endotélio mesenquimal destes órgãos, apesar de não haver colocalização entre os marcadores (figura 6.1, ponta de seta).

Além de corroborar achados de Togarrati et al. (2017) acerca da expressão de CD34 em glândulas salivares fetais humanas entre 16ª e 24ª semana de desenvolvimento, em nosso trabalho identificamos sítios de expressão mioepiteliais por meio de AML de maneira muito similar, onde o mioepitélio abraça estruturas de botões acinares em formação. Especificamente na GP, Actina de Músculo Liso (AML) exibe características de expressão peculiares. AML é a proteína clássica na identificação de células mioepiteliais utilizada neste estudo, no entanto, em GP, células mioepiteliais expressas por meio de AML puderam ser evidenciadas de modo

mais intenso somente a partir de 24 semanas do desenvolvimento, quando este tipo celular está provavelmente adquirindo características morfológicas melhor estabelecidas, integrando estruturas de botões terminais acinares e ductais intercalares.

A expressão de AML nas glândulas salivares de camundongos ocorre a partir do 16º dia de desenvolvimento (Nelson et al., 2013). Em nosso trabalho, porem, identificamos em mesmo modelo animal, a expressão de AML em vasos sanguíneos infundidos no mesênquima de GSM e GSL já a partir do 13º dia embrionário, no entanto, corroborando achados de Nelson et al. (2013), pudemos observar rudimentos da expressão mioepitelial por meio de AML no 16.5 dia embrionário de cultivo.

Ainda neste trabalho, Nelson et al. (2013) afirmam que as células mioepiteliais sofrem alterações morfológicas com o avanço da maturação parenquimal, assumindo características mais compactas e distendidas, uma vez que o mioepitélio acompanha a evolução epitelial dos botões e estruturas ductais intralobulares em desenvolvimento. Em nossos achados em camundongos não pudemos comparar estes dados, já que nosso período de cultivo foi somente realizado ate E16.5. No entanto, nas glândulas salivares humanas em desenvolvimento é possível evidenciar características morfológicas das células mioepiteliais passando por alterações de acordo com o avanço da maturação glandular em semanas, destacando-se de forma mais proeminente e robusta em torno dos botões epiteliais bem como em torno de ductos intralobulares, expressando-se também de maneira muito mais evidente por meio de AML onde foi possível identificar que o parênquima epitelial era melhor desenvolvido.

Apesar de glândulas salivares menores humanas assumirem morfologia acinar bem desenvolvida no período mais incipiente da maturação como anteriormente descrito, a ausência de expressão de AML nas células mioepiteliais dos estágios de botão inicial, indicam que, apesar de geralmente serem observadas como estruturas em estágio avançado de maturação ainda com 12 semanas, as células mioepiteliais ainda não completaram a sua maturação fenotípica.

Ainda, células mioepiteliais foram evidenciadas de modo evidente nas regiões de citoplasma e em seus prolongamentos abraçando sítios ductais em ramificação e botões acinares em estágios avançados do desenvolvimento glandular humano (até 24 semanas) (Lourenço et al., 2007) e, partindo da 8ª semana de desenvolvimento,

glândulas salivares maiores e menores expressaram AML em células mioepiteliais e vasculatura (Iañez et al., 2010), o que consolida nossas evidências sobre as etapas de maturação do citoesqueleto.

Assim como em nosso trabalho, Lourenço et al (2008) também detectaram a expressão de AML em vasos sanguíneos glandulares mesenquimais ainda nos estágios mais iniciais de maturação. Ainda, glândulas salivares menores humanas em desenvolvimento, expressam AML nas células mioepiteliais em torno de alguns sítios ductais e estruturas acinares após as fases de citodiferenciação (Martins et al., 2002). Tais dados estão de acordo com nossa pesquisa, onde AML em células mioepiteliais puderam ser identificadas nos estágios mais avançados do desenvolvimento, onde este tipo celular inicia o processo de maturação morfológica.

Apesar de não termos identificado a expressão de AML em células mioepiteliais de estruturas glandulares em estágio de botão inicial de entre a 4ª e 12ª semanas do desenvolvimento, foi possível observar rudimentos de mioepitélio expressos em células acinares por meio de S100 em estruturas de botão já em glândulas salivares menores de 12 semanas, além de estruturas de fibras nervosas ainda em estágios mais iniciais, corroborando achados de Iañez et al. (2010), onde S100 foi detectado a partir da 8ª semana embrionária em estruturas nervosas mesenquimais, além de mioepitélio de estruturas pseudoglandulares e canaliculares enovelando os sacos terminais.

Já em glândulas adultas, este mesmo estudo identificou a expressão de S100 em células mioepiteliais em estruturas acinares e em torno de ductos intercalares sendo, positivas para AML e S100 (Iañez et al., 2010). Hara et al. (1983) também observaram a expressão de S100β em células mioepiteliais envolvendo ductos intercalares e ácinos, além de nervos periféricos em diversos sítios. Além disso, a proteína S100 foi também localizada em células mioepiteliais de glândulas salivares totalmente desenvolvidas (Nakazato et al., 1985). Tais achados vão de encontro aos nossos resultados em estruturas glandulares nos estágios mais avançados do desenvolvimento (24 semanas), onde S100 pôde ser observado em células mioepiteliais abraçando ductos intercalares e evidenciados de maneira intensa no mioepitélio acinar.

Por outro lado, Dardick et al. (1991) descreveram a positividade de S100 apenas em finas fibras nervosas não mielinizadas em glândulas parótidas, compondo

uma intrincada rede de nervos adjacente aos ácinos, mas não nas células mioepiteliais, sendo erroneamente interpretadas como um marcador do mioepitélio glandular em ácinos.

Ainda, Katori et al. (2013), identificaram a expressão de S100 somente em glândulas sublinguais de fetos humanos entre a 15ª e 16ª semanas do desenvolvimento, mais especificamente nas células mioepiteliais acinares. Nas glândulas submandibulares, S100 foi identificado somente em finas fibras mesenquimais. Em nosso estudo, no entanto, glândulas maiores parótidas, submandibulares, bem como glândulas menores exibiram expressão para S100 tanto em células mioepiteliais de estruturas acinares em estágio canalicular e botão terminal na 16ª semana de desenvolvimento, quanto em fibras nervosas mesenquimais ainda em estágios mais incipientes, o que contraria, ainda, estudos realizados por Ogawa et al. (1999), onde não foi possível detectar a expressão de S100β em células mioepiteliais durante o período de embriogênese das glândulas salivares de ratos.

A expressão de S100 em períodos incipientes do desenvolvimento, não necessariamente pode representar a identificação de estruturas que virão a se tornar células mioepitelias, já que, durante o período de maturação, o mioepitélio celular é considerado pluripotente, podendo diferenciar-se em células acinares ou ductais.

Katori et al. (2013) sugerem que, também durante o desenvolvimento fetal humano, o suprimento nervoso contribua com a morfologia da glândula submandibular, uma vez que fibras nervosas são abundantemente distribuídas neste epitélio tipo epitelial formação. Tal compreensão foi também sugerida por Emmerson et al. (2017) em embriões de modelo animal, indicando que células progenitoras atuem em suporte durante o estabelecimento acinar durante o processo de desenvolvimento, além de achados de Knox et al. (2010) evidenciando a necessidade de receptores muscarínicos na manutenção das células-tronco epiteliais indiferenciadas necessárias à organogênese SG e ao processo de ramificação epitelial. Em nosso estudo foi possível observar extensiva expressão de fibras e feixes nervosos distribuídos não somente no mesênquima do epitélio das glândulas submandibulares, mas também no mesênquima glandular maior e menor indicando que, assim como ocorre em modelo animal, estruturas nervosas sejam cruciais ao desenvolvimento e maturação de glândulas salivares maiores e menores humanas.

Estruturas nervosas autonômicas simpáticas e parassimpáticas chegam até as glândulas salivares por diferentes vias, atingem o epitélio glandular e formam feixes do tipo Schwann-axônios, onde axônios dos distintos nervos autônomos se misturam associando-se às células de Schwann (Garrett; Kidd., 1993). Uma vez que S100 é expressa na células de Schwann, sendo estas estruturas nervosas que envolvem axônios de fibras neurais periféricas (Junqueira; Carneiro, 2008), baseamo-nos nestas evidências para compreender nossos resultados de dupla marcação entre S100 (proteína que se expressa também em células nervosas de Schwann) e Tuj1- (expressa nas estruturas nervosas simpáticas e parassimpáticas), onde além da colocalização em diversas fibras e feixes nervosos, identificamos a expressão de S100 e Tuj-1 em sítios diferentes de uma mesma estrutura nervosa, o que, possivelmente caracterizariam estruturas denominadas Schwann-axônios descritas por Garrett e Kidd (1993).

Usando Tubb3 como um marcador de nervo parassimpático axonal, representado por meio do anticorpo Tuj-1, Nedvetsky et al. (2014) observaram alterações glandulares estruturais durante a organogênese, descrevendo danos na expansão luminal de ductos em embriões de camundongos com função de inervação inibida. Nas glândulas salivares humanas em desenvolvimento, foi possível identificar intensa expressão de nervos autonômicos onde uma extensa rede de feixes e fibras nervosas seguindo ou mesmo enovelando a extensão ductal e de botões glandulares foram evidenciadas por meio de Tuj-1, sugerindo envolvimento no processo maturação glandular, quando nos baseamos nos resultados descritos por Nedvetsky et al. (2014).

Glândulas submandibulares de embriões de camundongos irradiadas, têm inervação parassimpática inibida por apoptose representada por meio de Tuj-1 em imunofluorescência (Knox et al., 2013) bem como a remoção de gânglio parassimpático alterou a população de células progenitoras (Knox et al., 2010) em GSM de embriões de camundongos. Além disso, nervos parassimpáticos foram considerados essenciais ao desenvolvimento acinar normal tanto em modelos de murinos, quanto em glândulas salivares humanas entre a 15ª e 24ª semanas de desenvolvimento (Emmerson at al., 2017). Latremoliere et a. (2018), cita que o marcador neuronal específico TUBB3 (identificado por meio de Tuj-1), o qual a função

não pode ser substituída por diferentes isotipos de β-tubulinas, atue na regeneração axonal periférica executando funções especializadas.

Tais achados nos levam a presumir que importância da inervação autônoma, representada em nosso estudo de modo tão intenso, seja crucial ao processo de maturação não somente das estruturas acinares e ductais glandulares, mas atuando também no mesênquima responsável pela sinalização de diversos e importantes processos de maturação glandular. A expressão de Tuj-1, específica em nervos autonômicos, foi o único marcador utilizado neste estudo que não coexpressou com nenhuma AQP em nenhum estágio do desenvolvimento ou semana de maturação analisados.

Apesar dos escassos estudos acerca da inervação autonômica e sua função com especial enfoque nas glândulas salivares em desenvolvimento, podemos sugerir com este estudo que a vascularização, as células mioepiteliais e a AQP1 podem atuar de forma conjunta, uma vez que tais marcadores puderam ser evidenciados em colocalização nas diversas estruturas vasculares (AQP1 e CD34, AQP1 e S100, AQP1 e AML) e mioepiteliais (AQP1 e S100, AQP1 e AML), embasados nas extensivas e solidas pesquisas disponíveis na literatura que associam a maturação epitelial de ácinos, ductos e células mioepiteliais das glândulas salivares com desenvolvimento vascular e nervoso.

7 CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse trabalho evidenciaram intensa expressão das AQPs 1, 3 e 5, das células mioepiteliais, vasculatura e inervação em diversos estágios do desenvolvimento e semanas de maturação das glândulas salivares humanas analisadas, o que sugere importante participação de tais mecanismos durante o desenvolvimento, fundamentados, ainda, em estudos prévios realizados com cada marcador em particular, disponíveis na literatura. Além disso, pudemos identificar a correlação da proteína de canal de água AQP1 atuando em conjunto com o desenvolvimento das células mioepiteliais e microvasculatura, sugerindo sua contribuição acerca do fornecimento de subsídios necessários à maturação do epitélio glandular e sua formação. Em suma, achados descritos e ilustrados neste trabalho respondem aos questionamentos iniciais do seguinte modo:

- AQP1 é expressa tanto no epitélio acinar e ductal nos primeiros estágios do desenvolvimento quanto em células mioepiteliais e vasculares das glândulas salivares humanas em diversos períodos da maturação, colocalizando-se, em determinados sítios, com CD34, AML e S100. Tais evidências sugerem importante correlação deste canal de água com estruturas essenciais ao processo de síntese e secreção salivar ainda no período de desenvolvimento, indicando que, nesta fase, a integração funcional de tais proteínas auxiliem no processo de maturação glandular.

- Glândulas submandibulares e sublinguais de embriões de camundongos entre E13.5 e E16.5 expressam AQP1 em estruturas ductais e acinares, além de microvasculatura, expressando-se majoritariamente com células estão em processo de mitose evidenciadas por meio de PH3.

- AQP3 foi expressa em células acinares e ductais nos diversos estágios do desenvolvimento e semanas de maturação glandular humana, não colocalizando-se com nenhuma estrutura mioepitelial, vascular ou nervosa.

- Glândulas submandibulares e sublinguais de embriões de camundongos entre E13.5 e E16.5 expressam AQP3 em raras celulas ductais e acinares, sendo evidenciada, de modo majoritário, em células mesenquimais que estão em processo de mitose não colocalizando-se com estruturas mioepitelial, vasculares ou nervosas, mas expressando-se, possivelmente, em vasos linfáticos.

- AQP5 foi expressa majoritariamente em membranas apicais acinares e ductais intercalares de modo intenso nos diversos estágios do desenvolvimento e semanas de maturação glandular humana, não colocalizando-se com nenhuma estrutura mioepitelial, vascular ou nervosa.

- Glândulas submandibulares e sublinguais de embriões de camundongos expressam AQP5 nas membranas apicais acinares e ductais somente após E14.5, não colocalizando nenhuma estrutura mioepitelial, vascular ou nervosa e, diferente das AQPs 1 e 3, sua expressão não está associada a processos mitóticos.

- Células vasculares expressam CD34 desde os estágios mais iniciais do desenvolvimento glandular humano, muitas vezes comunicando-se diretamente com as estruturas epiteliais glandulares em formação, colocalizando-se com AQP1 em diversos sítios de capilares e vasos sanguíneos.

- AML é expressa em diversos sítios vasculares desde os estágios mais iniciais do desenvolvimento glandular humano, bem como nas células mioepiteliais de glândulas salivares maiores e menores, colocalizando-se com AQP1 em diversos sítios mioepiteliais e vasos sanguíneos.

- S100 é expresso em diversos sítios vasculares (pericitos), bem como nas células mioepiteliais nos estágios mais incipientes do desenvolvimento glandular humano (4 semanas), além de fibras e feixes nervosos mesenquimais que também enovelam o parênquima glandular humano em formação. Sua colocalização com AQP1 foi detectada em sítios vasculares e mioepiteliais, mas não em estruturas nervosas.

- Tuj-1 é expresso somente em fibras e feixes nervosos mesenquimais que também enovelam estruturas epiteliais acinares, ductais e vasculares, desde os estágios mais incipientes do desenvolvimento glandular humano (4 semanas), não colocalizando-se com nenhuma das aquaporinas utilizadas neste estudo.

Com isso, os resultados obtidos neste estudo em modelos de glândulas salivares humanas em desenvolvimento e em embriões de camundongos corroboram resultados desmembrados previamente descritos na literatura, sugerindo que a estrutura mesenquimal glandular forme um microambiente crucial à morfogênese epitelial, onde a atuação das AQPs 1, 3 e 5 é evidenciada em diferentes sítios celulares, estágios do desenvolvimento e semanas de maturação e, de modo inédito, evidencia a atuação conjunta de AQP1, marcadores de microvasculatura e células mioepiteliais, além de relação entre AQPs 1 e 3 com processo de proliferação celular em glândulas salivares nos períodos mais incipiente dos desenvolvimento embrionário de camundongos. Diante disso, compreender o período inicial de expressão do mioepitélio glandular, vascularização, inervação periférica e sua correlação com elementos epiteliais expressando proteínas essenciais à salivação como as AQPs 1, 3 e 5 pode contribuir com valiosos estudos atuais relacionados à lesão e regeneração glandular.

REFERÊNCIAS[1]

Abir-Awan M, Kitchen P, Salman MM, Conner MT, Conner AC, Bill RM. Inhibitors of mammalian aquaporin water channels. Int J Mol Sci. 2019 Apr; 20(7):1589. doi: 10.3390/ijms20071589.

Acevedo LM, Lindquist JN, Walsh BM, Sia P, Cimadamore F, Chen C, Denzel M, Pernia CD, Ranscht B, Terskikh A, Snyder EY, Cheresh DA. hESC Differentiation toward an autonomic neuronal cell fate depends on distinct cues from the co-patterning vasculature. Stem Cell Reports. 2015 Jun 9;4(6):1075-88. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.04.013.

Agre P. The Aquaporin water channels. Proc Am Thorac Soc. 2006 Mar;3(1):5–13. doi: 10.1513/pats.200510-109JH.

Akamatsu T, Parvin MN, Murdiastuti K, Kosugi-Tanaka C, Yao C, Miki O, Kanamori N, Hosoi K. Expression and localization of aquaporins, members of the water channel family, during development of the rat submandibular gland. Pflugers Arch. 2003 Sep;446(6):641-51. doi: 10.1007/s00424-003-1109-9.

Alarcon-Martinez L, Yilmaz-Ozcan S, Yemisci M, Schallek J, Kılıç K, Can A, Di Polo A, Dalkara T. Capillary pericytes express α-smooth muscle actin, which requires prevention of filamentous-actin depolymerization for detection. Elife. 2018 Mar 21;7. pii: e34861. doi: 10.7554/eLife.34861.

Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. Acta Histochem Cytochem. 2012 Oct;31;45(5):241-50. doi: 10.1267/ahc.12013.

Anderson LC, Garrett JR. Neural regulation of blood flow in the rat submandibular gland. Eur J Morphol. 1998 Aug;36 Suppl:213-8.

Anttila SS, Knuuttila ML, Sakki TK. Depressive symptoms as an underlying factor of the sensation of dry mouth. Psychosom Med. 1998 Mar-Apr;60(2):215-8. doi: 10.1097/00006842-199803000-00018.

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Aure MH, Larsen HS, Ruus AK, Galtung HK. Aquaporin 5 distribution pattern during development of the mouse sublingual salivary gland. J Mol Histol. 2011 Oct;42(5):401-8. doi: 10.1007/s10735-011-9343-5.

Aure MH, Ruus AK, Galtung HK. Aquaporins in the adult mouse submandibular and sublingual salivary glands. J Mol Histol. 2014 Feb;45(1):69-80. doi: 10.1007/s10735-013-9526-3.

Avery JK. Desenvolvimento e histologia bucal. 3ª ed. Fajardo AP, Güntzel C, Souza FL, Brew MC, tradutores. Porto Alegre: Artmed; São Paulo, Santos; 2005.

Beroukas D, Hiscock J, Gannon BJ, Jonsson R, Gordon TP, Waterman SA. Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. Lab Invest. 2002 Nov;82(11):1547-52. doi: 10.1097/01.lab.0000038502.42845.9e.

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham B.J. A Colour Atlas and Textbook of Oral Anatomy Histology and Embryology. 2nd ed. Wolfe Publishing Ltd. 1992.

Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham B.J. Anatomia, embriologia e histologia bucal. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Bhattacharya S, García-Posadas L, Hodges RR, Makarenkova HP, Masli S, Dartt DA. Alteration in nerves and neurotransmitter stimulation of lacrimal gland secretion in the TSP-1-/- mouse model of aqueous deficiency dry eye. Mucosal Immunol. 2018 Jul;11(4):1138-48. doi: 10.1038/s41385-018-0002-y.

Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee WL. Lymphatic Vessel Network Structure and Physiology. Compr Physiol. 2018 Dec 13;9(1):207-99. doi: 10.1002/cphy.c180015.

Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. Nat Rev Cancer. 2015 Feb;15(2):96–109. doi: 10.1038/nrc3893.

Brunskill EW, Potter SS. Gene expression programs of mouse endothelial cells in kidney development and disease. PLoS One. 2010 Aug 10;5(8):e12034. doi: 10.1371/journal.pone.0012034.

Caccamo D, Katsetos CD, Herman MM, Frankfurter A, Collins VP, Rubinstein LJ. Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. Lab Invest. 1989 Mar;60(3):390-8.

Calamita G, Perret J, Delporte C. Aquaglyceroporins: drug targets for metabolic diseases? Front Physiol. 2018 Jul 10;9:851. doi: 10.3389/fphys.2018.00851.

Cao XC, Zhang WR, Cao WF, Liu BW, Zhang F, Zhao HM, Meng R, Zhang L, Niu RF, Hao XS, Zhang B. Aquaporin3 is required for FGF-2-induced migration of human breast cancers. PLoS One. 2013 8(2):e56735. doi: 10.1371/journal.pone.0056735.

Carraro G, Stripp BR. Roles for myoepithelial cells in the formation and maintenance of submucosal glands. Am J Respir Cell Mol Biol. 2017 Jun;56(6):685-86. doi: 10.1165/rcmb.2017-0044ED.

Catalán MA, Nakamoto T, Melvin JE. The salivary gland fluid secretion mechanism. J Med Invest. 2009 56 Suppl:192-6. doi: 10.2152/jmi.56.192.

Chamani G, Shakibi MR, Zarei MR, Rad M, Pouyafard A, Parhizkar A, Mansoori M. "Assessment of relationship between xerostomia and oral health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis". Oral Dis. 2017; 23(8):1162-7. doi: 10.1111/odi.12721.

Chan WY, Xia CL, Dong DC, Heizmann CW, Yew DT. Differential expression of S100 proteins in the developing human hippocampus and temporal cortex. Microsc Res Tech. 2003 Apr 15;60(6):600-13. doi: 10.1002/jemt.10302.

Chauvigné F, Yilmaz O, Ferré A, Fjelldal PG, Finn RN, Cerdà J. The vertebrate Aqp14 water channel is a neuropeptide-regulated polytransporter. Commun Biol. 2019 Dec 11;2(1):462. doi: 10.1038/s42003-019-0713-y.

Chen J, Wang T, Zhou YC, Gao F, Zhang ZH, Xu H, Wang SL, Shen LZ. Aquaporin 3 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2014; May 3;33:38. doi: 10.1186/1756-9966-33-38.

Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BV. Myoepithelial cells (MEC) of the salivary glands in health and tumours. J Clin Diagn Res. 2015 Mar;9(3):ZE14-8. doi: 10.7860/JCDR/2015/11372.5707.

Cockburn N, Pradhan A, Taing MW, Kisely S, Ford PJ. Oral health impacts of medications used to treat mental illness. Journal of Affective Disorders. 2017;223: 184–93. Doi10.1016/j.jad.2017.07.037.

David G, Llewellyn-Smith IJ. Poster communications: pregnancy causes changes in the innervation of vascular and non-vascular smooth muscle of the rat uterus. University of Manchester. Proc Physiol Soc. 2010;19:PC123.

Dardick I, Stratis M, Parks WR, DeNardi FG, Kahn HJ. S-100 protein antibodies do not label normal salivary gland myoepithelium. Histogenetic implications for salivary gland tumors. Am J Pathol. 1991 Mar;138(3):619-28.

Day RE, Kitchen P, Owen DS, Bland C, Marshall L, Conner AC, Bill RM, Conner MT. Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. Biochim Biophys Acta. 2014 May;1840(5):1492-506. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.09.033.

Delporte C, Chen ZJ, Baum BJ. Aquaporin 1 expression during the cell cycle in A5 cells. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Nov 12;228(2):223-8. doi: 10.1006/bbrc.1996.1645.

Delporte C, Steinfeld S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. Biochim Biophys Acta. 2006 Aug;1758(8):1061-70. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.01.022.

Delporte C, Bryla A, Perret J. Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. Int J Mol Sci. 2016 Jan 27;17(2). doi: 10.3390/ijms17020166.

Delporte C. Aquaporins and Gland Secretion. Adv Exp Med Biol. 2017 969:63-79. doi: 10.1007/978-94-024-1057-0_4

de Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Nico MMS, Lourenco SV. Overview of human salivary glands: highlights of morphology and developing processes. Anat Rec (Hoboken). 2017a Jul;300(7):1180-1188. doi: 10.1002/ar.23569.

de Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Coutinho-Camillo CM, Nico MMS, Lourenco SV. The expression of water channel proteins during human salivary gland development: a topographic study of aquaporins 1, 3 and 5.J Mol Histol. 2017b Dec;48(5-6):329-336. doi: 10.1007/s10735-017-9731-6.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. J Dent. 2005 Mar;33(3):223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.

Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. Biochim Biophys Acta. 1999 Jul 8;1450(3):191-231. doi: 10.1016/s0167-4889(99)00058-0.

Dongaonkar RM, Laine GA, Stewart RH, Quick CM. Balance point characterization of interstitial fluid volume regulation Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2009 Jul;297(1):R6-16. doi: 10.1152/ajpregu.00097.2009.

Dowd FJ. Saliva and dental caries. Dent Clin North Am. 1999;Oct;43(4):579-97.

Ekström J. Autonomic control of salivary secretion. Proc Finn Dent Soc. 1989 85(4-5):323-31.

Ekström J, Garrett JR, Månsson B, Rowley PS, Tobin G. Depletion of large dense-cored vesicles from parasympathetic nerve terminals in rat parotid glands after prolonged stimulation of the auriculotemporal nerve. Regul Pept. 1989 Apr;25(1):61-7. doi: 10.1016/0167-0115(89)90248-6.

Ellis GL, Auclair PL. AFIP Atlas of tumor pathology: the normal salivary glands. 4ª ed. Maryland: ARP Press; 2008.

Emmerson E, May AJ, Nathan S, Cruz-Pacheco N, Lizama CO, Maliskova L, Zovein AC, Shen Y, Muench MO, Knox SM. SOX2 regulates acinar cell development in the salivary gland. eLife. 2017; 6: e26620. doi: 10.7554/eLife.26620.

Ferraris ME, Munõz AC. Histologia e embriologia bucodental: bases estruturais dapPatologia, diagnóstico, tratamento e prevenção odontológica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Ferreira JN, Hoffman MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. Organogenesis. 2013 Jul-Sep;9(3):199-205. doi: 10.4161/org.25224.

Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. Blood. 1990 Jun 15;75(12):2417-26.

Galán-Cobo A, Ramírez-Lorca R, Serna A, Echevarría M. Overexpression of AQP3 Modifies the Cell Cycle and the Proliferation Rate of Mammalian Cells in Culture. PLoS One. 2015 Sep 14;10(9):e0137692. doi: 10.1371/journal.pone.0137692.

Galán-Cobo A, Ramírez-Lorca R, Toledo-Aral JJ, Echevarría M. Aquaporin-1 plays important role in proliferation by affecting cell cycle progression. J Cell Physiol. 2016 Jan;231(1):243-56. doi: 10.1002/jcp.25078.

Gao H, He C, Fang X, Hou X, Feng X, Yang H, Zhao X, Ma T. Localization of aquaporin-1 water channel in glial cells of the human peripheral nervous system. Glia. 2006 May;53(7):783-7. doi: 10.1002/glia.20336.

Garcia V, Chazin WJ. A new approach to discovery of S100 protein heterodimers. FEBS J. 2019 May;286(10):1838-1840. doi: 10.1111/febs.14851

Garrett JR. The proper role of nerves in salivary secretion: a review. J Dent Res. 1987 Feb;66(2):387-97. doi: 10.1177/00220345870660020201.

Garrett JR, Kidd A. The innervation of salivary glands as revealed by morphological methods. Microsc Res Tech. 1993 Sep 1;26(1):75-91. doi: 10.1002/jemt.1070260108.

Gils VT, Bouma G, Bontkes HJ, Mulder CJJ, Brand HS. Self-reported oral health and xerostomia in adult patients with celiac disease versus a comparison group. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology. 2017; 124(2), 152–156. doi: 10.1016/j.oooo.2017.05.475.

Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, Case RM, Steward MC. Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2001 Jul; 281(1):G247-54. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.1.G247

Hara K, Ito M, Takeuchi J, Iijima S, Endo T, Hidaka H. Distribution of S-100b protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1983;401(2):237-49. doi: 10.1007/bf00692648.

Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. Biol Cell. 2005 Jul;97(7):479-86. doi: 10.1042/BC20040104.

Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. J Am Soc Nephrol. 2006 Jan;17(1):39-45. doi: 10.1681/ASN.2005080846.

Hara-Chikuma M, Takahashi K, Chikuma S, Verkman AS, Miyachi Y. The expression of differentiation markers in aquaporin-3 deficient epidermis. Arch Dermatol Res. 2009 Mar;301(3):245-52. doi: 10.1007/s00403-009-0927-9.

Hardy G, Kramer B. The myoepithelium of human major salivary glands revisited. SADJ. 1998; Jul; 53(7):371-5.

Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol Biol Cell. 2001 Sep;12(9):2730-41.

Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. Monogr Oral Sci. 2014 May; 23;24:1-13. doi: 10.1159/000358776.

Hosseini ZF, Nelson DA, Moskwa N, Sfakis LM, Castracane J, Larsen M. FGF2-dependent mesenchyme and laminin-111 are niche factors in salivary gland organoids. J Cell Sci. 2018 Feb 20;131(4). pii: jcs208728. doi: 10.1242/jcs.208728.

Hosoi K. Physiological role of aquaporin 5 in salivary glands. Pflugers Arch. 2016; Apr;468(4):519-39. doi: 10.1007/s00424-015-1749-6.

Hsu JC, Yamada KM. Salivary gland branching morphogenesis-recent progress and future opportunities. Int J Oral Sci. 2010 Sep; 2(3):117-26. doi: 10.4248/IJOS10042.

Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. FASEB J. 2006 Sep;20(11):1892-4. Epub 2006 Jul 3. doi: 10.1096/fj.06-5930fje.

Iañez RF, Buim ME, Coutinho-Camillo CM, Schultz R, Soares FA, Lourenço SV. Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers. Histopathology. 2010 Sep;57(3):410-7. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03645.x.

Ichikawa H, Shibukawa Y, Sahara Y, Tsumura M, Qi B, Satoh K, Narita T, Hashimoto S, Momose Y, Tazaki M, Shimono M, Sugiya H. Electrophysiological properties of AQP6 in mouse parotid acinar cells. J Med Invest. 2009 56 Suppl:347-9. doi: 10.2152/jmi.56.347.

Ichiyama T, Nakatani E, Tatsumi K, Hideshima K, Urano T, Nariai Y, Sekine J. Expression of aquaporin 3 and 5 as a potential marker for distinguishing dry mouth

from Sjögren's syndrome. J Oral Sci. 2018;60(2):212-20. doi: 10.2334/josnusd.17-0150.

Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. Clin Exp Nephrol. 2009 Apr;13(2):107-17. doi: 10.1007/s10157-008-0118-6.

Ishibashi K, Tanaka Y, Morishita Y. The role of mammalian superaquaporins inside the cell. Biochim Biophys Acta. 2014 May;1840(5):1507-12. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.10.039.

Ishibashi K, Morishita Y, Tanaka Y. The Evolutionary Aspects of Aquaporin Family. Adv Exp Med Biol. 2017;969:35-50. doi: 10.1007/978-94-024-1057-0_2.

Ishikawa Y, Ishida H. Aquaporin water channel in salivary glands. Jpn J Pharmacol. 2000 Jun;83(2):95-101. doi: 10.1254/jjp.83.95.

Ishikawa Y, Cho G, Yuan Z, Inoue N, Nakae Y. Aquaporin-5 water channel in lipid rafts of rat parotid glands. Biochimica et Biophysica Acta. 2006 Aug;1758(8):1053-60. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.03.026.

Jaskoll T, Melnick M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF-alpha/EGF, IGF, TGF-beta, TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF-beta2, TGF-beta3, and EGF-r null mutations. Anat Rec. 1999 Nov;256(3):252–68. doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(19991101)256:3<252::AID-AR5>3.0.CO;2-6.

Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN, Stainier DYR. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. Development. 2005;132(23): 5199–209. doi: 10.1242/dev.02087.

Joo EE, Lombaert IMA, Yamada KM. Hyperacetylation of microtubules in mesenchymal cells increases cytokeratin 14–positive epithelial progenitors in developing salivary glands. J Dent Res. 2016 Dec;95(13):1518–1527. doi: 10.1177/0022034516662450.

Junqueira LCU, Carneiro J. Histologia Básica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Katchburian E, Arana V. Histologia e embriologia oral: texto, atlas e correlações clÍnicas. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

Katori Y, Hayashi S, Takanashi Y, Kim JH, Abe S, Murakami G, Kawase T. Heterogeneity of glandular cells in the human salivary glands: an immunohistochemical study using elderly adult and fetal specimens. Anat Cell Biol. 2013 Jun;46(2):101-12. doi: 10.5115/acb.2013.46.2.101.

Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Ohara S, Takano K, Suyama K, Hashimoto K, Nozawa R, Suzuki H, Hosoya M. Renal expression of alpha-smooth muscle actin and c-Met in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis. Pediatr Nephrol. 2008 Jun;23(6):913-9. doi: 10.1007/s00467-008-0749-6.

Kida H, Miyoshi T, Manabe K, Takahashi N, Konno T, Ueda S, Chiba T, Shimizu T, Okada Y, Morishima S. Roles of aquaporin-3 water channels in volume-regulatory water flow in a human epithelial cell line. J Membr Biol. 2005; Nov;208(1):55-64. doi: 10.1007/s00232-005-0819-7.

King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat. Am. J. Physiol. 1997; 273: C1541-C1548. doi:10.1152/ajpcell.1997.273.5.

Knox SM, Lombaert IMA, Reed X, Vitale-Cross L, Gutkind JS, Hoffman MP. Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. Science. 2010 Sep 24;329(5999):1645–47. doi: 10.1126/science.1192046.

Knox SM, Lombaert IM, Haddox CL, Abrams SR, Cotrim A, Wilson AJ, Hoffman MP. Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. Nat Commun. 2013; 4:1494. doi: 10.1038/ncomms2493.

Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towe JE, Doetschman T, Menon AG. Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. J Biol Chem. 2001; 276:23413–20. doi: 10.1074/jbc.M008760200.

Kwak M, Alston N, Ghazizadeh S. Identification of Stem Cells in the Secretory Complex of Salivary Glands. J Dent Res. 2016 Jul;95(7):776-83. doi: 10.1177/0022034516634664.

Kwon HR, Nelson DA, DeSantis KA, Morrissey JM, Larsen M. Endothelial cell regulation of salivary gland epithelial patterning. Development. 2017 Jan 15;144(2): 211–20.doi: 10.1242/dev.142497.

Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. Circulation Research. 2007;100(6):782–794. doi: 10.1161/01.RES.0000259593.07661.1e.

Lammert E, Cleaver O, Melton D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. Mech Dev. 2003;120(1):59–64. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00332-5.

Larsen HS, Ruus AK, Galtung HK. Aquaporin expression patterns in the developing mouse salivary gland. Eur J Oral Sci. 2009;117(6):655–62. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00695.x.

Larsen HS, Ruus AK, Schreurs O, Galtung HK. Aquaporin 11 in the developing mouse submandibular gland. Eur J Oral Sci. 2010 Feb;118(1):9-13. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00708.x.

Larsen HS, Aure MH, Peters SB, Larsen M, Messelt EB, Kanli Galtung H. Localization of AQP5 during development of the mouse submandibular salivary gland. J Mol Histol. 2011 Feb;42(1):71-81. doi: 10.1007/s10735-010-9308-0.

Larsen KR, Johansen JD, Reibel J, Zachariae C, Rosing K, Pedersen AML. Oral symptoms and salivary findings in oral lichen planus, oral lichenoid lesions and stomatitis. BMC Oral Health. 2017; 17(1):103. doi: 10.1186/s12903-017-0393-2.

Larrivée B, Freitas C, Suchting S, Brunet I, Eichmann A. Guidance of vascular development: lessons from the nervous system. Circ Res. 2009 Feb 27;104(4):428-41. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.188144.

Latremoliere A, Cheng L, DeLisle M, Wu C, Chew S,Hutchinson EB, Sheridan A, Alexandre C, Latremoliere F, SheuS, Golidy S, Omura T,Huebner EA, Fan Y, Whitman MC, Nguyen E, Hermawan C, Pierpaoli C, Tischfield MA, Woolf JC, Engle EC. Neuronal-specific TUBB3 is not required for normal neuronal function but is essential for timely axon regeneration. Cell Rep. 2018 Aug 14;24(7):1865–1879.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.029.

Lee MD, Bhakta KY, Raina S, Yonescu R, Griffin CA, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Preston GM, Agre P. The human aquaporin-5 gene. Molecular characterization and chromosomal localization. J Biol Chem. 1996; Apr;12;271(15):8599-604. doi: 10.1074/jbc.271.15.8599.

Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. Orthod Craniofac Res. 2009 Aug;12(3):206-11. doi: 10.1111/j.1601-6343.2009.01454.x.

Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO3 secretion. Physiol Rev. 2012 Jan;92(1):39-74. doi: 10.1152/physrev.00011.2011.

Li C, Wang W. Molecular biology of aquaporins. Adv Exp Med Biol. 2017 969:1-34. doi: 10.1007/978-94-024-1057-0_1.

Li L, Gao X, Song Y, Xu H, Yu G, Zhu Z, Liu J. Anatomy of arteries and veins of submandibular glands. Chin Med J (Engl). 2007 120(13):1179-82. doi: 10.1097/00029330-200707010-00013.

Lombaert IM, Knox SM, Hoffman MP. Salivary gland progenitor cell biology provides a rationale for therapeutic salivary gland regeneration. Oral Dis. 2011 Jul;17(5):445-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01783.x.

Lourenço SV, Kapas S. Integrin expression in developing human salivary glands. Histochem Cell Biol. 2005 Nov;124(5):391-9. doi: 10.1007/s00418-005-0784-3.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Uyekita SH, Soares FA. Human salivary gland branching morphogenesis: Morphological localization of claudins and its parallel relation with developmental stages revealed by expression of cytoskeleton and secretion markers. Histochem Cell Biol. 2007 Oct;128(4):361–9. doi: 10.1007/s00418-007-0322-6

Lourenço SV, Uyekita SH, Lima DM, Soares FA. Developing human minor salivary glands: Morphological parallel relation between the expression of TGF-beta isoforms and cytoskeletal markers of glandular maturation. Virchows Arch. 2008 Apr;452(4):427–34. doi: 10.1007/s00428-007-0552-y

Loy F, Serra MP, Boi M, Isola R, Ekström J, Quartu M. Tyrosine-hydroxylase, dopamine β-hydroxylase and choline acetyltransferase-like immunoreactive fibres in the human major sublingual gland. Arch Oral Biol. 2020 Jan;109:104571. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104571.

Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. J Biol Chem. 1999 Jul 16;274(29):20071-4. doi: 10.1074/jbc.274.29.20071.

Magenheim J, Ilovich O, Lazarus A, Klochendler A, Ziv O, Werman R, Hija A, Cleaver O, Mishani E, Keshet E. Blood vessels restrain pancreas branching, differentiation and growth. Development. 2011 Nov;138(21):4743-52. doi: 10.1242/dev.066548.

Makita T, Sucov HM, Gariepy CE, Yanagisawa M, Ginty DD. Endothelins are vascular-derived axonal guidance cues for developing sympathetic neurons. Nature. 2008 Apr 10;452(7188):759-63. doi: 10.1038/nature06859.

Mandel ID. The functions of saliva. J Dent Res. 1987 66:623-627. DOI: 10.1177/00220345870660S203.

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). Biochem Biophys Res Commun. 2004 Oct 1;322(4):1111-22. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.096.

Mariani M, Karki R, Spennato M, Pandya D, He S, Andreoli M, Fiedler P, Ferlini C. Class III β-tubulin in normal and cancer tissues. Gene. 2015 Jun 1;563(2):109-14. doi: 10.1016/j.gene.2015.03.061.

Martins MD, Cavalcanti de Araujo CV, Raitz R, Soares de Araújo N. Expression of cytoskeletal proteins in developing human minor salivary glands. Eur J Oral Sci. 2002 Aug;110(4):316-21. doi: 10.1034/j.1600-0722.2002.21360.x.

Maruyama CL, Monroe MM, Hunt JP, Buchmann L, Baker OJ. Comparing human and mouse salivary glands: A practice guide for salivary researchers. Oral Dis. 2019 Mar;25(2):403-15. doi: 10.1111/odi.12840.

Mata M, Alessi D, Fink DJ. S100 is preferentially distributed in myelin-forming Schwann cells. J Neurocytol. 1990 Jun;19(3):432-42. doi: 10.1007/bf01188409.

Matsuki M, Hashimoto S, Shimono M, Murakami M, Fujita-Yoshigaki J, Furuyama S, Sugiya H. Involvement of aquaporin-5 water channel in osmoregulation in parotid secretory granules. J Membr Biol. 2005 Feb;203(3):119-26. doi: 10.1007/s00232-005-0736-9.

Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Aquaporin-5 (AQP5), a water channel protein, in the rat salivary and lacrimal glands: immunolocalization and effect of secretory stimulation. Cell Tissue Res. 1999 Mar;295:513–21. doi: 10.1007/s004410051257.

Matsuzaki T, Susa T, Shimizu K, Sawai N, Suzuki T, Aoki T, Yokoo S, Takata K. Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. Acta Histochem Cytochem. 2012 Oct 31;45(5):251-9. doi: 10.1267/ahc.12018.

Mattingly A, Finley JK, Knox SM. Salivary gland development and disease. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2015 Nov-Dec;4(6):573-90. doi: 10.1002/wdev.194.

Mauri-Obradors E, Estrugo-Devesa A, Jané-Salas E, Viñas M, López-López J. Oral manifestations of Diabetes Mellitus. A systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2017 Sep 1;22(5):e586-e594. doi: 10.4317/medoral.21655.

Mcbride MI, Baillie J, Poland BJ. Growth parameters in normal fetuses. Teratology. 1984; 29:185-91. doi.org/10.1002/tera.1420290207.

Melnick M, Jaskoll T. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(2):199-215. doi: 10.1177/10454411000110020401.

Memberg SP, Hall AK. Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin. J Neurobiol. 1995 May;27(1):26-43. doi: 10.1002/neu.480270104.

Milanowski M, Pomastowski P, Ligor T, Buszewski B. Saliva - Volatile Biomarkers and Profiles. Crit Rev Anal Chem. 2017 May 4;47(3):251-66. doi: 10.1080/10408347.2016.1266925.

Mobasheri A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. Am J Physiol Cell Physiol. 2004; Mar;286(3):C529-37. doi: 10.1152/ajpcell.00408.2003.

Mobasheri A, Wray S, Marples D. Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. J Mol Histol. 2005 Feb;36(1-2):1-14. doi: 10.1007/s10735-004-2633-4.

Moeller HB, Fuglsang CH, Fenton RA. Renal aquaporins and water balance disorders. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016 Mar;30(2):277-88. doi: 10.1016/j.beem.2016.02.012.

Molin SO, Rosengren L, Haglid K, Baudier J, Hamberger A. Differential localization of "brain-specific" S-100 and its subunits in rat salivary glands. J Histochem Cytochem. 1984 Aug;32(8):805-14. doi: 10.1177/32.8.6747272.

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. Biochem Biophys Res Commun. 1965 Jun 9;19(6):739-44. doi: 10.1016/0006-291x(65)90320-7.

Moss SJ. Clinical implications of recent advances in salivary research. J Esthet Dent. 1995;7(5):197-203. doi: 10.1111/j.1708-8240.1995.tb00580.x.

Nakamura M, Saga T, Watanabe K, Takahashi N, Tabira Y, Kusukawa J, Yamaki K. An immunohistochemistry-based study on aquaporin (AQP)-1, 3, 4, 5 and 8 in the parotid glands, submandibular glands and sublingual glands of Sjögren's syndrome mouse models chronically administered cevimeline. Kurume Med J. 2013; 60(1):7-19. doi: 10.2739/kurumemedj.ms60227.

Nakazato Y, Ishida Y, Takahashi K, Suzuki K. Immunohistochemical distribution of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in normal and neoplastic salivary glands. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1985 405(3):299-310. doi: 10.1007/bf00710066.

Nanci A. Ten Cate's Oral histology: development, structure and function. 7th ed. St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier; 2008.

Nanci A. Ten Cate's histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

Nedvetsky PI, Emmerson E, Finley JK, Ettinger A, Cruz-Pacheco N, Prochazka J, Haddox CL, Northrup E, Hodges C, Mostov KE, Hoffman MP, Knox SM. Parasympathetic innervation regulates tubulogenesis in the developing salivary gland. Dev Cell. 2014 Aug 25;30(4):449-62. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.012.

Nelson DA, Manhardt C, Kamath V, Sui Y, Santamaria-Pang A, Can A, Bello M, Corwin A, Dinn SR, Lazare M, Gervais EM, Sequeira SJ, Peters SB, Ginty F, Gerdes MJ, Larsen M. Quantitative single cell analysis of cell population dynamics during submandibular salivary gland development and differentiation. Biol Open. 2013 Apr 18;2(5):439-47. doi: 10.1242/bio.20134309.

Null M, Agarwal M. Anatomy, Lymphatic System. [Updated 2019 Jun 22]. In: StatPearls [ebook]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Jan-. [citado 10 dez. 2019]. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513247/

Ogawa Y, Yamauchi S, Ohnishi A, Ito R, Ijuhin N. Immunohistochemistry of myoepithelial cells during development of the rat salivary glands. Anat Embryol (Berl). 1999 Aug;200(2):215-28. doi: 10.1007/s004290050274.

Ogawa Y. Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. Prog Histochem Cytochem. 2003; 38(4):343-426. doi: 10.1016/s0079-6336(03)80001-3.

Oh SJ, Moon D. Spindle cell myoepithelioma of the parotid gland. Arch Craniofac Surg. 2019 Oct;20(5):336-40. doi: 10.7181/acfs.2018.02341.

Omitola OG, Iyogun CA. Immunohistochemical study of salivary gland tumors in a tertiary institution in South-South Region of Nigeria. J Oral Maxillofac Pathol. 2018 May-Aug;22(2):163-67. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_108_17.

Ouanounou A. Xerostomia in the geriatric patient: causes, oral manifestations, and treatment. Compend Contin Educ Dent. 2016; May;37(5):306-311;quiz312.

Ozdemir T, Srinivasan PP, Zakheim DR, Harrington DA, Witt RL, Farach-Carson, MC Pradhan-Bhatt S. Bottom-up assembly of salivary gland microtissues for assessing myoepithelial cell function. Biomaterials. 2017;142:124–35. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.022

Park EJ, Jung HJ, Choi HJ, Jang HJ, Park HJ, Nejsum LN, Kwon TH. Exosomes co-expressing AQP5-targeting miRNAs and IL-4 receptor-binding peptide inhibit the migration of human breast cancer cells. FASEB J. 2020 Jan 10. doi: 10.1096/fj.201902434R.

Patel VN, Rebustini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. Differentiation. 2006 Sep;74(7):349-64. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00088.

Patel VN, Hoffman MP. Salivary gland development: a template for regeneration. Semin Cell Dev Biol. 2014 Jan-Feb;25-26:52-60. doi: 10.1016/j.semcdb.2013.12.001.

Paunovic B, Deng X, Khomenko T, Ahluwalia A, Tolstanova G, Tarnawski A, Szabo S, Sandor Z. Molecular mechanisms of basic fibroblast growth factor effect on healing of ulcerative colitis in rats. J Pharmacol Exp Ther. 2011 Nov;339(2):430-7. doi: 10.1124/jpet.111.183665.

Person F, Wilczak W, Hube-Magg C, Burdelski C, Möller-Koop C, Simon R, Noriega M, Sauter G, Steurer S, Burdak-Rothkamm S, Jacobsen F. Prevalence of βIII-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. Tumour Biol. 2017 Oct;39(10):1010428317712166.

Petschnik AE, Fell B, Kruse C, Danner S. The role of alpha-smooth muscle actin in myogenic differentiation of human glandular stem cells and their potential for smooth muscle cell replacement therapies. Expert Opin Biol Ther. 2010 Jun;10(6):853-61. doi: 10.1517/14712591003769832.

Poirier K, Saillour Y, Bahi-Buisson N, Jaglin XH, Fallet-Bianco C, Nabbout R, Castelnau-Ptakhine L, Roubertie A, Attie-Bitach T, Desguerre I, Genevieve D, Barnerias C, Keren B, Lebrun N, Boddaert N, Encha-Razavi F, Chelly J. Mutations in the neuronal ß-tubulin subunit TUBB3 result in malformation of cortical development and neuronal migration defects. Hum Mol Genet. 2010 Nov 15;19(22):4462-73. doi: 10.1093/hmg/ddq377.

Porcheri C, Mitsiadis TA. Physiology, pathology and regeneration of salivary glands. Cells. 2019 Sep;8(9):976. doi: 10.3390/cells8090976.

Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. Auton Neurosci. 2007 Apr 30;133(1):3-18. doi: 10.1016/j.autneu.2006.10.006

Proctor GB, Carpenter GH. Salivary secretion: mechanism and neural regulation. Monogr Oral Sci. 2014; 24:14-29. doi: 10.1159/000358781.

Proctor GB. The physiology of salivary secretion. Periodontol 2000. 2016 Feb;70(1):11-25. doi: 10.1111/prd.12116.

Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. J Histochem Cytochem. 2006 Apr;54(4):385-95. doi: 10.1369/jhc.4A6514.2005.

Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. Microsc Res Tech. 1994 Jan 1;27(1):25-45. doi: 10.1002/jemt.1070270103.

Riley P, Glenny AM, Hua F, Worthington HV. Pharmacological interventions for preventing dry mouth and salivary gland dysfunction following radiotherapy. The Cochrane Database oSyst Rev. 2017;7(7): CD012744. doi.org/10.1002/14651858.CD012744.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 1995;11:73-91. doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000445.

Roblegg E, Coughran A, Sirjani D. Saliva: an all-rounder of our body. Eur J Pharm Biopharm. 2019 Sep;142:133-41. doi: 10.1016/j.ejpb.2019.06.016.

Rodriguez RA, Liang H, Chen LY, Plascencia-Villa G, PerryG. Single-channel permeability and glycerol affinity of human aquaglyceroporin AQP3. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2019 Apr 1;1861(4):768-75. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.01.008.

Romaniello R, Arrigoni F, Bassi MT, Borgatti R. Mutations in α- and β-tubulin encoding genes: implications in brain malformations. Brain Dev. 2015 Mar;37(3):273-80. doi: 10.1016/j.braindev.2014.06.002.

Roussa E. Channels and transporters in salivary glands. Cell Tissue Res. 2011 Feb;343(2):263-87. doi: 10.1007/s00441-010-1089-y.

Sapmaz E, Uysal M, Tumer MK, Sapmaz HI, Somuk BT, Arici A, Tas U. Investigation of age-related changes in the expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 in the salivary glands of mice. Acta Otolaryngol. 2016 Sep;136(9):937-43. doi: 10.3109/00016489.2016.1165353.

Saruta J, To M, Sakaguchi W, Kondo Y, Tsukinoki K. Brain-derived neurotrophic factor is related to stress and chewing in saliva and salivary glands. Jpn Dent Sci Rev. 2020 Dec;56(1):43-9. doi: 10.1016/j.jdsr.2019.11.001.

Satou R, Shibukawa Y, Kimura M, Sugihara N. Light conditions affect rhythmic expression of aquaporin 5 and anoctamin 1 in rat submandibular glands. Heliyon. 2019 Nov 14;5(11):e02792. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02792.

Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. Hippokratia. 2008 Oct-Dec; 12(4): 198–204.

Sekiguchi R, Martin D; Genomics and Computational Biology Core, Yamada KM. Single-Cell RNA-seq Identifies Cell Diversity in Embryonic Salivary Glands. J Dent Res. 2020 Jan;99(1):69-78. doi: 10.1177/0022034519883888.

Shah AA, Mulla AF, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. J Oral Maxillofac Pathol. 2016 Sep-Dec;20(3):480-90. doi: 10.4103/0973-029X.190952.

Shan Z, Li J, Zheng C, Liu X, Fan Z, Zhang C, Goldsmith CM, Wellner RB, Baum BJ, Wang S. Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated miniature pig parotid glands. Mol Ther. 2005 Mar;11(3):444-51. doi: 10.1016/j.ymthe.2004.11.007.

Sheng Y, Zhu L. The crosstalk between autonomic nervous system and blood vessels. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol. 2018 Mar 10;10(1):17-28.

Shubin AD, Sharipol A, Felong TJ, Weng PL, Schutrum BE, Joe DS, Aure MH, Benoit DSW, Ovitt CE. Stress or injury induces cellular plasticity in salivary gland acinar cells. Cell Tissue Res. 2020 Jan 4. doi: 10.1007/s00441-019-03157-w.

Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. Angiogenesis. 2012 Mar;15(1):151-63. doi: 10.1007/s10456-011-9251-z.

Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. J Immunol. 1992 Jan 1;148(1):267-71.

Sisto M, Lorusso L, Ingravallo G, Tamma R, Nico B, Ribatti D, Ruggieri S, Lisi S. Reduced myofilament component in primary Sjögren's syndrome salivary gland myoepithelial cells. J Mol Histol. 2018 Apr;49(2):111-121. doi: 10.1007/s10735-017-9751-2.

Sisto M, Ribatti D, Lisi S. Aquaporin water channels: New perspectives on the potential role in inflammation. Adv Protein Chem Struct Biol. 2019 116:311-345. doi: 10.1016/bs.apcsb.2018.11.010.

Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L. Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. J Histochem Cytochem. 1989 Mar;37(3):315-21. doi: 10.1177/37.3.2918221

Sohail K, Siddiqi KM, Baig MZ, Sahibzada HA, Maqbool S. Salivary Biomarker Interleukin-8 Levels in Naswar Users and Non-users. J Coll Physicians Surg Pak. 2020 Jan;30(1):99-101. doi: 10.29271/jcpsp.2020.01.99.

Soyfoo MS, Chivasso C, Perret J, Delporte C. Involvement of Aquaporins in the Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. Int J Mol Sci. 2018 Oct 30;19(11). pii: E3392. doi: 10.3390/ijms19113392.

Speirs RL. Secretion of saliva by human lip mucous glands and parotid glands in response to gustatory stimuli and chewing. Arch Oral Biol.1984;29(11):945–48. doi: 10.1016/0003-9969(84)90096-7.

Stamers K, Skagers A, Pastars K, Tomisheva N, Ratniece M. Functional activity of rabbit salivary glands in reduced and restored regional arterial blood supply conditions. Stomatologija. 2010;12(1):28-32.

Stefanski A, Tomiak C, Pleyer U, Dietrich T, Burmester GR, Dörner T. The Diagnosis and Treatment of Sjögren's Syndrome. Dtsch Arztebl Int. 2017 May;114(20): 354–61. doi: 10.3238/arztebl.2017.0354.

Strojan P, Hutcheson KA, Eisbruch A, Beitler JJ, Langendijk JA, Lee AWM, Corry J, Mendenhall WM, Smee R, Rinaldo A, Ferlitok A. Treatment of late sequelae after radiotherapy for head and neck cancer. Cancer Treat Rev. 2017 Sep;59:79–92. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.07.003.

Tada J, Sawa T, Yamanaka N, Shono M, Akamatsu T, Tsumura K, Parvin MN, Kanamori N, Hosoi K. Involvement of vesicle-cytoskeleton interaction in AQP5 trafficking in AQP5-gene-transfected HSG cells. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Dec 20;266(2):443-7. doi: 10.1006/bbrc.1999.1828

Teshima THN, Wells KL, Lourenço SV, Tucker AS. Apoptosis in early salivary gland duct morphogenesis and lumen formation. J Denl Res. 2016 Mar;95(3), 277–83. doi: 10.1177/0022034515619581.

Teymoortash A, Wiegand S, Borkeloh M, Bette M, Ramaswamy A, Steinbach-Hundt S, Neff A, Werner JA, Mandic R. Variations in the expression and distribution pattern of AQP5 in acinar cells of patients with sialadenosis. In Vivo. 2012 Nov-Dec;26(6):951-5.

Tischfield MA, Baris HN, Wu C, Rudolph G, Van Maldergem L, He W, Chan WM, Andrews C, Demer JL, Robertson RL, Mackey DA, Ruddle JB, Bird TD, Gottlob I, Pieh C, Traboulsi EI, Pomeroy SL, Hunter DG, Soul JS, Newlin A, Sabol LJ, Doherty EJ, de Uzcátegui CE, de Uzcátegui N, Collins ML, Sener EC, Wabbels B, Hellebrand H, Meitinger T, de Berardinis T, Magli A, Schiavi C, Pastore-Trossello M, Koc F, Wong AM, Levin AV, Geraghty MT, Descartes M, Flaherty M, Jamieson RV, Møller HU, Meuthen I, Callen DF, Kerwin J, Lindsay S, Meindl A, Gupta ML Jr, Pellman D, Engle EC. Human TUBB3 mutations perturb microtubule dynamics, kinesin interactions, and axon guidance. Cell. 2010 Jan 8;140(1):74-87. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.011.

Togni L, Mascitti M, Santarelli A, Contaldo M, Romano A, Serpico R, Rubini C. Unusual conditions impairing saliva secretion: developmental anomalies of salivary glands. Front Physiol. 2019 Jul 3;10:855. doi: 10.3389/fphys.2019.00855.

Togarrati PP, Sasaki RT, Abdel-Mohsen M, Dinglasan N, Deng X, Desai S, Emmerson E, Yee E, Ryan WR, da Silva MCP, Knox SM, Pillai SK, Muench MO. Identification and characterization of a rich population of CD34+ mesenchymal stem/stromal cells in human parotid, sublingual and submandibular glands. Sci Rep. 2017 Jun 14;7(1):3484. doi: 10.1038/s41598-017-03681-1.

Togarrati PP, Dinglasan N, Desai S, Ryan WR, Muench MO. CD29 is highly expressed on epithelial, myoepithelial, and mesenchymal stromal cells of human salivary glands. Oral Dis. 2018 May;24(4):561-72. doi: 10.1111/odi.12812.

Tucker AS. Salivary gland development. Semin Cell Dev Biol. 2007 Apr; 18 (2):237-44. doi: 10.1016/j.semcdb.2007.01.006.

Ventimiglia MS, Rodriguez MR, Morales VP, Elverdin Endothelins participate in the central and peripheral regulation of submandibular gland secretion in the rat Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2011 Jan;300(1):R109-20. doi: 10.1152/ajpregu.00041.2010.

Verkman AS. Aquaporin water channels and endothelial cell function. J Anat. 2002 Jun;200(6): 617–27. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00058.x.

Wakayama Y, Jimi T, Inoue M, Kojima H, Shibuya S, Murahashi M, Hara H, Oniki H. Expression of aquaporin 3 and its localization in normal skeletal myofibres. Histochem J. 2002 Jun-Jul;34(6-7):331-7. doi: 10.1023/a:1023382609541.

Wang D, Iwata F, Muraguchi M, Ooga K, Ohmoto Y, Takai M, Mori T, Ishikawa Y. Correlation between salivary secretion and salivary AQP5 levels in health and disease. J Med Invest. 2009 56 Suppl:350-3. doi: 10.2152/jmi.56.350.

Wang H, Schoebel S, Schmitz F, Dong H, Hedfalk K. Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. Biochim Biophys Acta Biomembr. 2020 Feb 1;1862(2):183065. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.183065.

Wang W, Hart PS, Piesco NP, Lu X, Gorry MC, Hart TC. Aquaporin expression in developing human teeth and selected orofacial tissues. Calcif. Tissue Int. 2003 72:222–227. doi: 10.1007/s00223-002-1014-9.

Wang Y, Wu G, Fu X, Xu S, Wang T, Zhang Q, Yang Y. Aquaporin 3 maintains the stemness of CD133+ hepatocellular carcinoma cells by activating STAT3. Cell Death Dis. 2019 Jun 13;10(6):465. doi: 10.1038/s41419-019-1712-0.

Wellner RB, Redman RS, Swaim WD, Baum BJ. Further evidence for AQP8 expression in the myoepithelium of rat submandibular and parotid glands. Pflugers Arch. 2006 Feb;451(5):642-5. doi: 10.1007/s00424-005-1489-0

Yang B, Song Y, Zhao D, Verkman AS. Phenotype analysis of aquaporin-8 null mice. Am J Physiol Cell Physiol. 2005 May;288(5):C1161-70. doi: 10.1152/ajpcell.00564.2004.

Yoshida N, Sugimoto K, Suzuki S, Kudo H. Change in oral health status associated with menopause in Japanese dental hygienists. Int J Dent Hyg. 2018 Feb;16(1):157-164. doi: 10.1111/idh.12282.

Zhang W, Wang H, Zhang S, Zhong L, Wang Y, Pei Y, Han J, Cao S. Lipid Supplement in the Cultural Condition Facilitates the Porcine iPSC Derivation through cAMP/PKA/CREB Signal Pathway. Int J Mol Sci. 2018 Feb 8;19(2). pii: E509. doi: 10.3390/ijms19020509.

Zhu C, Jiang Z, Bazer FW, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Aquaporins in the female reproductive system of mammals. Front Biosci (Landmark Ed). 2015 Jan 1;20:838-71. doi: 10.2741/4341.

Zhu Z, Jiao L, Li T, Wang H, Wei W, Qian H. Expression of AQP3 and AQP5 as a prognostic marker in triple-negative breast cancer.Oncol Lett. 2018 Aug;16(2):2661-2667. doi: 10.3892/ol.2018.8955.

Zyrianova T, Basova LV, Makarenkova H. Isolation of Myoepithelial Cells from Adult Murine Lacrimal and Submandibular Glands. J Vis Exp. 2019 Jun 11;(148). doi: 10.3791/59602.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo morfológico e avaliação da expressão protéica das aquaporinas de glândulas salivares da mucosa oral em desenvolvimento e glândulas salivares comprometidas pela
Síndrome de Sjögren

Pesquisador: Silvia Vanessa Lourenço
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 19775213.0.0000.0068
Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Patrocinador Principal: Universidade de Sao Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 456.090
Data da Relatoria: 02/10/2013

Apresentação do Projeto:
Projeto realizará análise de material de biópsia contendo tecido de mucosa oral, cujo diagnóstico clínico e histopatológico é de Sìndrome de Sjogren (30 pacientes) e material contendo tecido de mucosa oral fetal entre 14-25 semanas de desenvolvimento (20 amostras). O material pertence ao arquivo do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:
Investigar as alterações morfológicas e histopatológicas das glândulas salivares das mucosas relacionadas aos sintomas de xerostomia dos pacientes com diagnóstico de Síndrome de Sjogren e de glândulas salivares em diversas fases de desenvolvimento, através da análise da expressão proteica das aquaporinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Não há risco ao sujeito de pesquisa pois a análise será realizada em tecido já previamente coletado e estocado no Departamento de Dermatologia.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa pertinente pois há poucos estudos que tentam esclarecer a fisiopatologia da xerostomia na Síndrome de Sjogren.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi enviado o documento autorizando a pesquisadora executante a utilizar as amostras estocadas.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 13 de Novembro de 2013

Assinador por:
Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (emenda)

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo topográfico e correlação das aquaporinas 1,3 e 5 e do suprimento sanguíneo e nervoso de glândulas salivares humanas em desenvolvimento.

Pesquisador: Silvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 19775213.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.193.040

Apresentação do Projeto:

Projeto realizará análise de material contendo tecido de mucosa oral e glândulas salivares fetais humanas de até 25 semanas de desenvolvimento (50 fetos diferentes). O material pertence ao arquivo do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a morfologia das glândulas salivares em diversas fases de desenvolvimento, através da análise dos espécimes histologicamente processados em hematoxilina e eosina e da expressão protéica de aquaporinas, marcadores mioepiteliais, vasculares e neurais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta emenda não envolve os riscos ou benefícios do projeto uma vez que as análises serão realizadas em material já coletado. A metodologia foi alterada para imuno-histoquímica em dupla marcação, imunofluorescência parafinada e técnica de whole mount e morfometria.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda trata-se de modificação de amostra de 20 para 50, acréscimo das técnicas de morfometria, imunofluorescência parafinada e Whole mount, microscopia confocal por fluorescência e dos anticorpos CD31, CD34, Calponina, S100, e Actina de Músculo liso. Além

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

disso inclui como centro participante a Faculdade de Odontologia da USP pois a aluna Fernanda de Paula dos Santos está regularmente matriculada nesta instituição e o projeto fará parte de tese de doutorado da mesma.

A aluna de graduação Micherlaine Moreno Pereira foi adicionada como membro da equipe para realizar a análise morfométrica das glândulas em desenvolvimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As alterações solicitadas referentes a emenda foram realizadas

Recomendações:

Ciente das alterações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda não apresenta pendencias éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_925459_E2.pdf	22/05/2017 15:42:35		Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadealteracao.pdf	22/05/2017 15:40:44	Silvia Vanessa Lourenço	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	xmirchpb.docx	22/05/2017 15:34:17	Silvia Vanessa Lourenço	Aceito
Outros	Registro Online nº 11168 - Projeto Aquaporinas.pdf	09/09/2013 10:53:06		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - Projeto Aquaporinas.pdf	27/08/2013 12:59:18		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE

Continuação do Parecer: 2.193.040

SAO PAULO, 31 de Julho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

FACULDADE DE ODONTOLOGIA USP - SÃO PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo topográfico e correlação das aquaporinas 1,3 e 5 e do suprimento sanguíneo e nervoso de glândulas salivares humanas em desenvolvimento.

Pesquisador: Silvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19775213.0.3001.0075

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.201.792

Apresentação do Projeto:

Este projeto se refere a uma solicitação de emenda de uma pesquisa que se iniciou em 2013, aprovada por Comitê de Ética, já com uma emenda também aprovada Projeto. O projeto atual realizará análise de material contendo tecido de mucosa oral e glândulas salivares fetais humanas de até 25 semanas de desenvolvimento (50 fetos diferentes). O material pertence ao arquivo do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a morfologia das glândulas salivares em diversas fases de desenvolvimento, através da análise dos espécimes histologicamente processados em hematoxilina e eosina e da expressão protéica de aquaporinas, marcadores mioepiteliais, vasculares e neurais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Esta emenda não envolve os riscos ou benefícios do projeto uma vez que as análises serão realizadas em material já coletado. A metodologia foi alterada para imunoistoquímica em dupla marcação, imunofluorescência parafinada e técnica de whole mount e morfometria.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A emenda trata-se de modificação de amostra de 20 para 50, acréscimo das técnicas de morfometria, imunofluorescência parafinada e Whole mount, microscopia confocal por

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

fluorescência e dos anticorpos CD31, CD34, Calponina, S100, e Actina de Músculo liso. Além disso inclui como centro participante a Faculdade de Odontologia da USP pois a aluna Fernanda de Paula dos Santos está regularmente matriculada nesta instituição e o projeto fará parte de tese de doutorado da mesma. A aluna de graduação Micherlaine Moreno Pereira foi adicionada como membro da equipe para realizar a análise morfométrica das glândulas em desenvolvimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados: Informações básicas, carta de alteração, folha de rosto, autorização da instituição, projeto detalhado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_925459_E2.pdf	22/05/2017 15:42:35		Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartadealteracao.pdf	22/05/2017 15:40:44	Silvia Vanessa Lourenço	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	xmirchpb.docx	22/05/2017 15:34:17	Silvia Vanessa Lourenço	Aceito
Outros	Registro Online nº 11168 - Projeto Aquaporinas.pdf	09/09/2013 10:53:06		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - Projeto Aquaporinas.pdf	27/08/2013 12:59:18		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 04 de Agosto de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br