

Mariana Correia de Oliveira Alves

**Envolvimento do sulfeto de hidrogênio (H₂S) na secreção salivar de
α-amilase “*ex-vivo*” em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará

Versão parcial

São Paulo

2019

RESUMO

ALVES, M.C.O. **Envolvimento do sulfeto de hidrogênio (H₂S) na secreção salivar de α -amilase “*ex-vivo*” em camundongos.** 111 páginas, Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A saliva é um fluido biológico composto por eletrólitos e proteínas, que tem suma importância na homeostase bucal e geral do indivíduo. É produzida a partir das glândulas salivares maiores (submandibular, sublingual e parótida) e das glândulas salivares menores (espalhadas por toda a mucosa bucal e língua). A estimulação da salivação se dá por ativação do sistema nervoso autônomo (receptores α_2 e β_2 -adrenérgicos e M1 e M3 colinérgicos), o que desencadeia cascatas metabólicas com abertura de canais iônicos, que conduzem a liberação de eletrólitos, água e proteínas para os ductos das células acinares, que vão desembocar na cavidade bucal. Nas últimas décadas tem-se demonstrado que o sulfeto de hidrogênio (H₂S) é um gasotransmissor envolvido em diversos sistemas fisiológicos, desempenhando importante papel nos sistemas cardiovascular, nervoso central e digestório, além de ter grande importância moduladora do processo inflamatório. Não obstante, a eventual participação do H₂S nos aspectos qualitativos/quantitativos da salivação é ainda desconhecida. Por esse motivo decidimos estudar a presença deste gasotransmissor no processo de salivação e a sua interferência na secreção de α -amilase. Para este estudo utilizamos glândulas salivares submandibular e sublingual de camundongos para avaliar a secreção *ex-vivo* da enzima α -amilase, assim como a participação do H₂S endógeno (empregando inibidores da sua produção enzimática) e os efeitos do H₂S exógeno (utilizando doadores de H₂S). Ainda avaliamos a geração de sulfeto por homogenatos de glândulas salivares e mediante técnicas de Western-blotting e RT-PCR analisamos a expressão proteica e gênica das enzimas geradoras de H₂S nestes homogenatos. Nossos achados mostram que as glândulas salivares estudadas expressam as enzimas responsáveis pela síntese de H₂S (CSE, cistationina- γ -

liase e 3MST, 3-mercaptopiruvato sulfotransferase). Incubação dessas glândulas com o agonista isoproterenol (via simpática) ou carbacol (via parassimpática) na presença de ácido amino-oxiacético (AOAA) causou significativa redução na secreção de α -amilase. Por outro lado, a presença do reagente de Lawesson, um doador orgânico de H_2S no meio de incubação das glândulas, na presença do agonista isoproterenol (via simpática) ou carbacol (via parassimpática) resulta em aumento da secreção de α -amilase quando utilizado na concentração de 1 μM . Nossos resultados são coerentes com a visão de que o H_2S potencializa a secreção *ex-vivo* de α -amilase estimulada pelo sistema nervoso autônomo simpático (mediada pelos receptores β -adrenérgicos) e parassimpático (mediada por receptores muscarínicos) em camundongo. Estes achados podem contribuir futuramente com o desenvolvimento de fármacos utilizados no tratamento de pacientes com disfunções salivares com a intenção de diminuir os inúmeros efeitos colaterais associados aos parassimpatomiméticos atualmente no mercado.

Palavras-chave: Sulfeto de hidrogênio. Glândulas salivares. α -Amilase. Camundongo.

ABSTRACT

ALVES, M. C. O. **The role of hydrogen sulfide (H₂S) on the “ex-vivo” murine salivary secretion of alpha-amylase.** 111 pages. (Masters thesis in Pharmacology). ICB, University of São Paulo, São Paulo, 2019

Saliva is a biological fluid containing electrolytes and proteins, of crucial importance for the oral and general body homeostasis. It is produced by salivary glands, described as major (submandibular, sublingual, and parotid glands) and minor (scattered all over the oral mucosa and tongue). Saliva is released upon autonomic stimulation (α_2 and β_2 -adrenergic and M1 e M3 cholinergic receptors) which triggers a series of metabolic cascades to open ionic channels and activate other pathways as to release electrolytes, proteins and water into specialized ducts that open in the mouth. In the last few decades hydrogen sulfide (H₂S) has been characterized as a gasotransmitter which displays important physiological roles in cardiovascular, central nervous and digestive systems. In addition, it has been demonstrated to have definite modulatory actions on inflammatory processes. Notwithstanding, the participation of H₂S in qualitative and quantitative aspects of salivation is still largely unknown. Accordingly, we investigated the presence of that gas in salivary glands and its possible effects on α -amylase secretion. Western blotting and PCR analyses confirmed that the mouse submandibular and sublingual salivary glands express at least two H₂S-synthesizing enzymes (CSE, cystathionin- γ -liase and 3MST, 3-mercaptopyruvate-sulfotransferase). Incubation of these glands with the autonomic agonists isoproterenol (sympathetic pathway) and carbachol (parasympathetic pathway) in the presence of the H₂S-synthesizing enzyme inhibitor amino-oxiacetic acid (AOAA) caused significant reduction of α -amylase secretion, whereas incubation in the presence of a low concentration (1 μ M) of the organic H₂S donor Lawesson reagent (LR) evoked the opposite effect. Our results are coherent with the view that H₂S can be taken as an important gasotransmitter in the murine major salivary glands, with a definite modulating, positive role on the

physiological stimulating action of sympathetic (through β -adrenergic receptors) and parasympathetic (through muscarinic receptors) autonomic nervous system. Our findings could possibly contribute for the future development of drugs targeting relief of salivary dysfunction symptoms, aiming to reduce the adverse effects of parasympathetic drugs currently used.

Keywords: hydrogen sulfide, major salivary glands, α -amylase, mouse

1 INTRODUÇÃO

1.1 Saliva

Fluido orgânico de grande importância para a manutenção da homeostase bucal e geral do organismo, a saliva tem papel fundamental na percepção do paladar, limpeza da cavidade bucal e hidratação da mucosa (SALEH et al., 2015). Entre suas múltiplas funções, citam-se ainda a proteção dos dentes e da cavidade orofaríngea, facilitação na articulação da fala, sua função essencial para a mastigação e a deglutição, ações digestivas e o papel fundamental na manutenção do balanço da microbiota (PEDERSEN et al., 2018).

De coloração cristalina pura, inodora, densidade relativa de 1,004-1,009 e pH de 6,6–7,1 (ZHANG et al., 2016), a saliva é composta 99% por água, sendo que o 1% restante compreende eletrólitos, glicoproteína, mucina, IgA, calicreína, muco, α -amilase, lipase lingual e diversas outras enzimas (DAWES et al., 2015; ZHANG et al., 2016). Em comparação com o plasma, a saliva tem característica hipotônica, com maiores concentrações de K^+ e HCO_3^- e menores concentrações de Na^+ e Cl^- (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Cumpre ressaltar que, dependendo do tipo de estimulação e da glândula estimulada, essas características, como viscosidade e distribuição quantitativa de eletrólitos e proteínas, podem variar (NOGUEIRA; CARVALHO, 2017).

Além dos fatores relativos à estimulação e glândula estimulada, outro fator que pode alterar a composição quantitativa e qualitativa da saliva é uma variedade de doenças orais ou sistêmicas, como por exemplo a doença de Alzheimer, diabetes, fibrose cística, síndrome de Sjögren e doenças oncológicas (especialmente aquelas que afetam a região da cabeça e pescoço) (CHOJNOWSKA et al., 2018).

Alguns trabalhos defendem que o fluxo salivar normal em humanos está entre 1 e 1,5 L/dia (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; MATCZUK et al., 2017), enquanto outros citam que o fluxo normal de salivação seria 600 mL por dia

(ZHANG et al., 2016). Outros ainda descrevem como salivacção normal a taxa de 0,3 mL/min sem estimulação enquanto que, em presença de estímulo, a salivacção passa à taxa de 1 mL/min (NOGUEIRA; CARVALHO, 2017). Esse fluxo obedece a um ritmo circadiano de alta amplitude, tendo como pico de salivacção o final da tarde e um fluxo extremamente baixo durante o sono (DAWES et al., 2015). Há ainda um ritmo circanual, onde o pico de fluxo ocorre no inverno, enquanto no verão a taxa de salivacção é menor (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Essas variações estão relacionadas não apenas ao fluxo salivar, mas também às concentrações de proteínas e outros constituintes salivares. (RUDNEY, 1995).

As múltiplas funções da saliva estão relacionadas tanto às suas características físicas quanto à especificidade de seus componentes (Figura 1). Alguns exemplos de funções relacionadas às características de fluidez da saliva são limpeza da cavidade oral, solubilização dos alimentos, formação do bolo alimentar, facilitação da mastigação e deglutição, diluição de detritos e lubrificação (PEDERSEN et al., 2002).

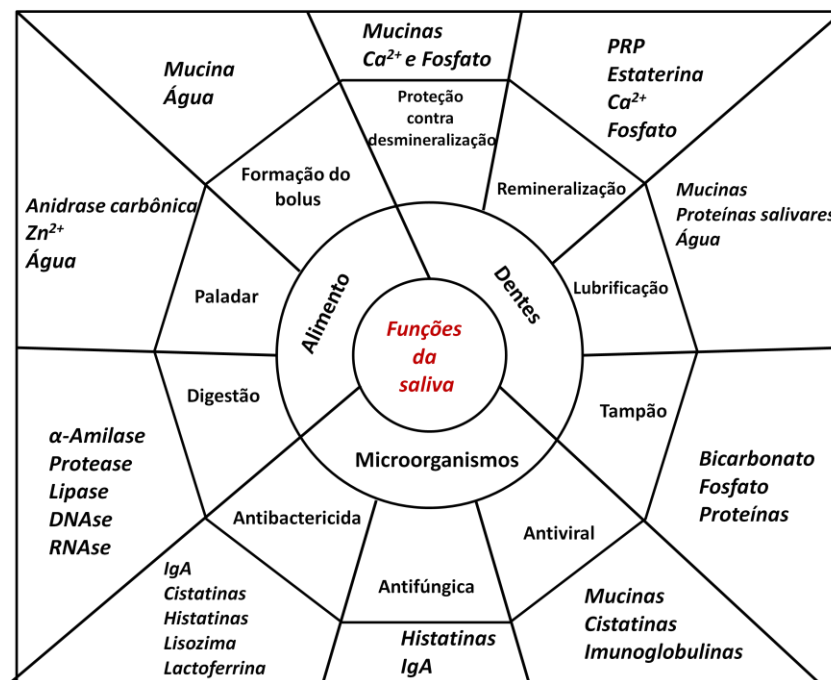


Figura 1 – Funções da saliva, mostrando resumidamente seus constituintes básicos e seus papéis fisiológicos respectivos.

A concentração e a qualidade das proteínas e dos polipeptídeos presentes na saliva são de suma importância para a manutenção da saúde bucal e a homeostase geral do organismo. Frequentemente a ocorrência e gravidade das doenças bucais estão associadas qualitativa e quantitativamente a mudanças no proteoma salivar. Este proteoma é composto por moléculas como histatina, mucina, lactoperoxidase, defensinas, proteínas ricas em prolina e lactoferrina, que regulam a flora microbiana da cavidade oral, exercendo efeitos bactericidas (HEMADI et al., 2017). Além disso, a saliva é responsável pela formação de uma película protetora tanto nos dentes quanto na mucosa bucal que contém proteínas como a mucina e a IgA (GIBBINS et al., 2014).

A percepção do sabor dos alimentos só pode ocorrer através da interação das substâncias organolépticas em solução com receptores gustativos específicos. Sendo assim, a saliva desempenha um papel fundamental, visto que, ao fornecer o líquido para a dissolução e distribuição destas substâncias na cavidade oral, ela possibilita sua chegada até as papilas gustativas, onde se encontram os receptores gustativos. (MATSUO, 2009). Destaque-se ainda a influência direta do pH salivar sobre a percepção dos sabores (DAWES et al., 2015).

A α -amilase salivar parece ser essencial para a percepção do sabor do amido, pois, durante a mastigação, hidrolisa rapidamente as ligações 1,4-glicosídicas nas cadeias de iniciação poliméricas para produzir sacarídeos de cadeias mais curtas, incluindo maltose, oligômeros e polímeros de glicose de cadeia curta, sendo que estes produtos de hidrólise de amilase salivar parecem ser críticos para a percepção do sabor do amido (LAPIS et al., 2017).

A limpeza da cavidade oral também é prerrogativa da saliva. Esta limpeza é de suma importância para a manutenção da saúde dos dentes, e pode ser representada pelo sistema de sifão incompleto (DAWES, 1983), sendo que, após a deglutição, um volume residual de saliva é sempre deixado na boca. A Figura 2 ilustra o fato de a depuração do açúcar ocorrer quando os receptores

de paladar estimulados acionam os nervos que indicarão para a glândula salivar um aumento do fluxo de salivação. Esse aumento do fluxo faz que com que o volume de saliva na cavidade oral alcance o nível máximo, estimulando assim a deglutição.

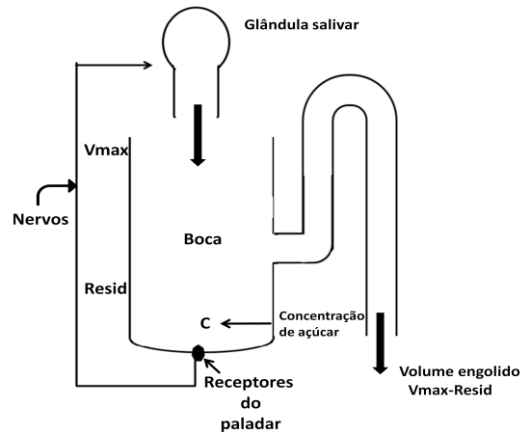


Figura 2 – Modelo de sifão incompleto (adaptado de (DAWES, 1983).

V_{max} = volume máximo de saliva na cavidade oral.

Além de suas funções fisiológicas clássicas, a saliva também é muito útil no diagnóstico e monitoramento de muitas doenças sistêmicas, estudos farmacocinéticos e farmacovigilância.

O diagnóstico usando a saliva como material de estudo apresenta algumas vantagens em relação ao sangue e à urina, que são os dois fluidos mais utilizados atualmente em exames laboratoriais. A coleta da saliva é extremamente fácil, pouco invasiva e requer poucas instruções. Em relação ao plasma, possui menor teor de proteína e menor complexidade (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015).

Doenças como câncer de cabeça e pescoço, tumores malignos de ovário, câncer de mama, dengue, vírus da imunodeficiência humana (HIV), malária, diabetes mellitus, esclerose múltipla, doenças cardiovasculares e do trato gastrointestinal, sarcoidose, doenças do córtex supra-renal, infecções virais, fúngicas e bacterianas, fibrose cística, obesidade, síndrome metabólica e síndrome de Sjögren, podem ser facilmente detectadas na saliva, pela análise de marcadores específicos (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015;

CHOJNOWSKA et al., 2018). Estudo recente de Santos e colaboradores demonstra que a presença da proteína t-Tau na saliva, é indicativo da doença de Alzheimer sendo, portanto possível a utilização dessa proteína como biomarcador da doença e útil no seu monitoramento e análise de evolução (SANTOS; PAULINO; PARDI, 2017).

Alguns fármacos que possuem janela terapêutica muito estreita (por exemplo, lítio, digoxina, fenobarbital e outros) devem ser monitorados com frequência, principalmente em pacientes com comprometimento hepático e renal. Métodos específicos facilitam essa análise através da saliva (CHIAPPIN et al., 2007).

Algumas substâncias de abuso também podem ser detectadas na saliva humana incluindo álcool, anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepínicos, cocaína, dietilamida do ácido lisérgico (LSD), opiáceos, e nicotina. O teste salivar dessas substâncias é particularmente útil quando for necessária uma resposta “sim/não” ou seja, para avaliações quantitativas/semi-quantitativas da presença destas substâncias no organismo. Há várias propostas para as possibilidades oferecidas pela saliva quanto à detecção de compostos proteicos, e este campo de pesquisa parece ser uma nova fronteira para fins de testes esportivos (controle *antidoping*, CHIAPPIN et al., 2007).

1.2 Glândulas Salivares

A saliva é produzida e secretada por estruturas denominadas glândulas salivares. Essas glândulas são classificadas em maiores (incluem as glândulas submandibular, sublingual e parótida) e menores (em número de 800 a 1.000 glândulas), distribuídas por toda a mucosa oral (CHOJNOWSKA et al., 2018, Figura 3).

A maior das glândulas salivares é a parótida, localizada entre o músculo esternocleidomastóideo e o masseter, cobrindo o ramo da mandíbula e transbordando essas estruturas para trás e na frente. A glândula é encerrada dentro de uma divisão na fáscia (profunda) do pescoço. Os gânglios linfáticos

da parótida encontram-se tanto em cima como profundamente na fáscia parótida (ELLIS, 2012).

A glândula é dividida em lobos superficiais e profundos pelo nervo facial e cerca de 20% da população apresenta um tecido parotídeo acessório, localizado anteriormente à glândula parótida principal, medindo cerca de 6 mm. O tecido glandular acessório é histologicamente distinto do tecido parotídeo, pois pode conter células acinares mucosas além das células acinares serosas geralmente encontradas na glândula parótida (KOCHHAR; LARIAN; AZIZZADEH, 2016).

A unidade secretora básica da glândula parótida consiste em um ácino, um ducto secretor e um ducto coletor. São ácinos serosos que contêm células em forma de pirâmide com núcleo basal arredondado ao redor do lúmen e grânulos de secreção no ápice. Cada ácino é cercado por uma camada de células mioepiteliais, que por sua vez é delimitada por uma camada distinta de membrana basal (KOCHHAR; LARIAN; AZIZZADEH, 2016).

A glândula parótida é responsável por aproximadamente 25% da salivação total em estado não estimulado. Quando há uma estimulação salivar, a parótida aumenta seu fluxo em cerca de 10 a 15% (MATCZUK et al., 2017).

Localizada no canto inferior do triangulo submandibular, a glândula submandibular é menor que a parótida e é considerada uma glândula mista, pois apresenta células mucosas e serosas, embora estas últimas estejam presentes em maior quantidade (CHOJNOWSKA et al., 2018). Mesmo sendo menor que a parótida, é a submandibular a responsável pela maior produção de saliva não estimulada. Cerca de 60% de todo o fluxo salivar não estimulado é de sua responsabilidade (MATCZUK et al., 2017).

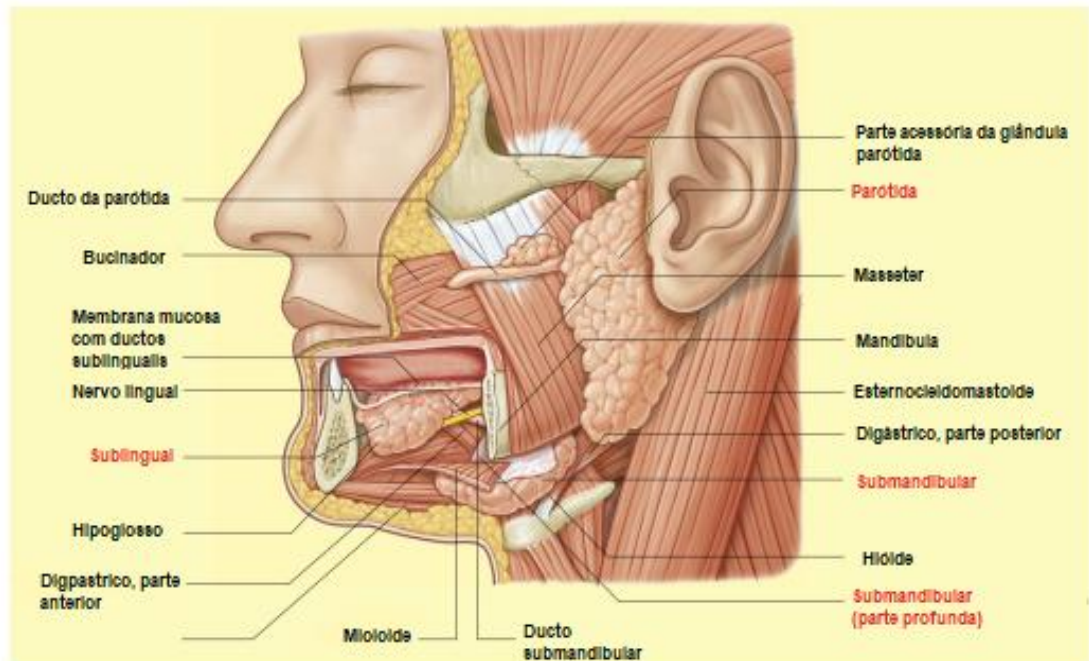


Figura 3 – Localização das glândulas submandibular, sublingual e parótida e estruturas adjacentes na espécie humana. (adaptado de ELLIS, 2012).

Por fim, a glândula sublingual, a menor das glândulas salivares maiores, é constituída por 5–20 pequenas glândulas, sendo também considerada uma glândula mista, embora secrete na maioria das vezes uma saliva mucosa (CHOJNOWSKA et al., 2018). Na ausência de estimulação, a glândula sublingual é responsável por 7-8% do fluxo salivar total (MATCZUK et al., 2017).

Em roedores as glândulas submandibular e sublingual estão localizadas juntas, na região anterior do pescoço, entre os linfonodos e o esterno. Ambas estão encapsuladas na mesma fáscia (AMANO et al., 2012).

Noventa por cento de toda a saliva produzida são devidos à atividade das glândulas submandibular e parótida, que necessitam da disponibilidade de energia e dos substratos para a biossíntese. Quando há estimulação salivar ocorre aumento da atividade glicolítica e esse aumento de atividade está associado à ativação do ciclo de Krebs (NOGUEIRA; CARVALHO, 2017).

A arquitetura anatômica das três glândulas é essencialmente a mesma, ou seja, uma estrutura ductal arborizada abrindo-se para a cavidade bucal com os terminais secretórios, os ácinos, produzindo saliva (HOLMBERG; HOFFMAN, 2014). Durante o desenvolvimento embrionário as glândulas são formadas em estágios graduais e sequenciais (pré-brotamento, brotamento inicial, pseudo-glandular, canalicular e broto terminal, (HARUNAGA; HSU; YAMADA, 2011).

As glândulas salivares são cercadas por uma cápsula, compostas por lobos que são divididos em porções menores, denominadas lóbulos. Estes são constituídos por três tipos de células, as células acinares, as ductais e as mioepiteliais (Figura 4). As células acinares são as responsáveis pela secreção de fluidos que drenam para os ductos formados pelas células ductais (DENNY; BALL; REDMAN, 1997; AMANO et al., 2012).

Os ácinos, ou porção secretória, podem ser classificados em mucosos, serosos ou seromucosos. Ácinos mucosos têm como característica células em formato de coluna (alongadas) com núcleo achatado localizado próximo à membrana basal. Os ácinos serosos apresentam células piramidais basofílicas menores, com núcleo arredondado. Os ácinos seromucosos são compostos por muitas porções mucosas e uma porção serosa em formato crescente chamada *demilune* (DELPORTE; BRYLA; PERRET, 2016).

Circundando os ácinos e os ductos intercalados, encontram-se as células mioepiteliais. Estas células são controladas pelo sistema nervoso autônomo e, após a contração, acredita-se que auxiliem o fluxo de saliva, comprimindo os ácinos e ductos, e que também forneçam resiliência estrutural ao parênquima durante a secreção. Entretanto, não há até o momento, evidências conclusivas sobre a necessidade da atuação dessas células no processo de salivação (PEDERSEN et al., 2018).

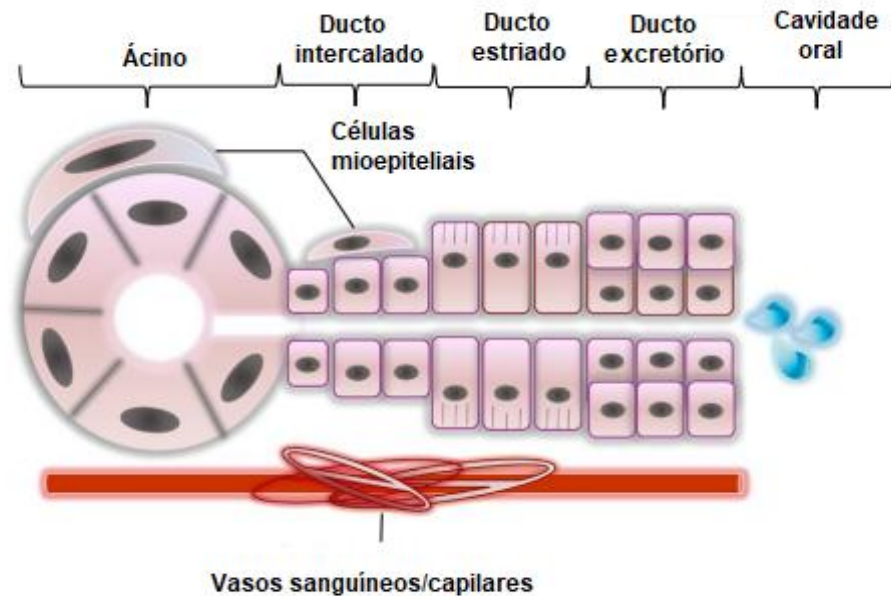


Figura 4 – Adenômero: unidade secretora e ductos. Observamos aqui o esquema das unidades secretoras de saliva, compostas por um ácino cujo fluido produzido desemboca nos ductos que secretam a saliva final na cavidade oral (adaptado de PEDERSEN et al., 2018).

O sistema de ductos em glândulas salivares humanas é composto por ducto estriado, ducto intercalado e ducto excretório. O ducto estriado, rico em mitocôndrias, é o responsável pela secreção e reabsorção de eletrólitos (entrada de K^+ e saída de Na^+ e Cl^-) resultando em uma saliva final hipotônica em relação ao plasma. Esse movimento é realizado pelo bombeamento ativo transmembrana, através de canais iônicos, o qual envolve gasto energético. O ducto intercalado está localizado entre o ácino e a ducto estriado e pouco contribui para a constituição da secreção salivar. Ele recebe a saliva primária, provinda do ácino, que é isotônica em relação ao plasma. Há dados sugestivos de que o ducto intercalado inclui células-tronco das glândulas salivares. O sistema de ductos termina por fim com o ducto excretor, composto por células colunares, cuja função ainda não está estabelecida. Sabe-se, entretanto, que este ducto pode estar envolvido tanto na secreção quanto na reabsorção do

fluido salivar, e esta dinâmica tem o papel adicional de prover a sensação subjetiva do estado de umidificação da cavidade bucal (AMANO et al., 2012).

Em roedores há presença de um ducto granular na glândula submandibular, entre os ductos estriado e intercalado. Esse ducto é composto por 3 tipos de células, um tipo colunar granuloso que é o mais comum, uma célula escura e estreita não granulada, de ocorrência rara e células mioepiteliais entre as células epiteliais e basais. Nesses ductos encontram-se receptores androgênicos, com alta afinidade para a testosterona, cuja ativação estimula o desenvolvimento dessas células. Isso explica um dimorfismo sexual comum nos roedores evidenciado pela presença de número muito maior de células granulosas em machos do que em fêmeas (GRESIK, 1994; AMANO et al., 2012). De fato, essa diferenciação, que ocorre aos 25 dias de vida nos camundongos e aos 42 dias de vida nos ratos (GRESIK, 1994), mostra uma dependência multi-hormonal caracterizada por OLIVEIRA-FILHO et al. (1992).

A secreção salivar é controlada sinergicamente por ambas as divisões do sistema nervoso autônomo, o simpático e o parassimpático. A estimulação parassimpática se dá via receptores muscarínicos causando uma salivação fluida, rica em água e eletrólitos, enquanto a estimulação simpática ocorre via receptores β -adrenérgicos e produz uma pequena quantidade de saliva, rica em proteínas (DEL FIACCO et al., 2010). Esta secreção é regulada reflexamente; o arco reflexo envolve um componente aferente, o núcleo salivatório e um componente eferente ativador (PEDERSEN et al., 2018, Figura 5).

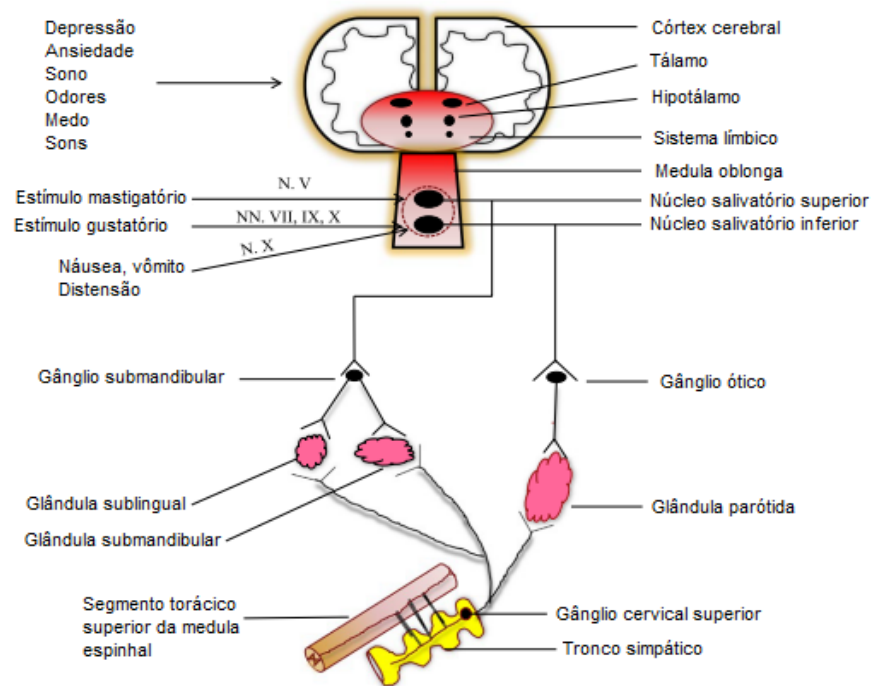


Figura 5 – Esquema da regulação da secreção salivar (ver o texto, adaptado de PEDERSEN et al., 2018).

Os nervos aferentes conduzem estímulos sensoriais que surgem da ativação gustatória dos quimiorreceptores (via nervos facial [VII], glossofaríngeo [IX] e vago [X]) ou da ativação de mecanorreceptores ou nociceptores (via nervo trigêmeo [V]). Os núcleos salivatórios também recebem impulsos de estruturas cerebrais superiores, o que influencia a secreção salivar. Entradas aferentes são integradas no centro salivatório, que então ativam a parte eferente do arco reflexo, compreendendo nervos parassimpáticos e simpáticos. As glândulas parótidas recebem sinais parassimpáticos do nervo glossofaríngeo que fazem sinapse no gânglio ótico. As glândulas submandibular e sublingual recebem sinais parassimpáticos do nervo facial que fazem sinapse no gânglio submandibular (CHOJNOWSKA et al., 2018). Os nervos simpáticos emergem da cadeia paravertebral simpática e fazem sinapse no gânglio cervical superior. Os nervos simpáticos pós-ganglionares seguem os vasos sanguíneos para as glândulas salivares inervadas. Os neurotransmissores acetilcolina e norepinefrina são liberados das terminações nervosas parassimpáticas e simpáticas pós-ganglionares, respectivamente, e provocam a secreção salivar. Durante o processo da estimulação outros co-transmissores são liberados (v.

adiante), e exercem efeitos moduladores na formação da saliva (PEDERSEN et al., 2018).

Os receptores muscarínicos envolvidos na estimulação salivar através da mediação da acetilcolina são principalmente do subtipo M3, com alguma participação do subtipo M1 (GAUTAM, 2004). Na via simpática ocorre a participação dos receptores α_1 e β_1 -adrenérgicos (PEDERSEN et al., 2018).

Além dos principais neurotransmissores acetilcolina e norepinefrina, há uma variedade de neuropeptídeos, incluindo a substância P e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que também são responsáveis pela estimulação da salivação (PROCTOR; CARPENTER, 2014).

Há dois tipos de relação célula-nervo nas glândulas salivares, uma denominada epilemal, onde o axônio aproxima-se da célula alvo, sem, no entanto, penetrá-la. Nesse caso, o neurotransmissor deve difundir-se através desse espaço (uma espécie de espaço sináptico) até alcançar o receptor. Outra relação é a hipolemálica, onde o axônio penetra a lâmina basal e trafega entre as células secretoras. Esta relação varia de acordo com as células e o tipo de glândula (PROCTOR; CARPENTER, 2007).

Para iniciar as principais vias de transporte de íons necessárias à formação dos fluidos primários, a secreção salivar é dependente de aumento da concentração de cálcio intracelular livre (aumento da $[Ca^{+2}]_i$ livre), fato que ocorre em resposta à estimulação dos receptores. O nível da $[Ca^{+2}]$ citosólico é aumentado devido à estimulação da proteína $G_{q/11}$ acoplada, primeiramente aos receptores muscarínicos M3 e M1 ativados pela acetilcolina, e os receptores α_1 -adrenérgicos ativados pela norepinefrina, o que redundará em ativação da fosfolipase C (PLC). Esta promove a hidrólise de 4,5-bisfosfato (PIP_2) e conseqüente geração de 1,4,5-inositol trifosfato (IP_3). Os receptores de IP_3 no retículo endoplasmático (ER) são então ativados e ocorre liberação rápida de Ca^{+2} do retículo. Este aumento da concentração é

subsequentemente sustentado pelo influxo de cálcio (LIU; ONG; AMBUDKAR, 2018; PEDERSEN et al., 2018, Figura 6).

A elevação de $[Ca^{+2}]_i$ regula a função de transportadores de íons e canais, tais como o cotransportador $Na^+/K^+/2Cl^-$ (NKCC1), anoctamina 1 (ANO1) e canal de K^+ dependente de Ca^{+2} , que induzem um transporte vetorial de Cl^- do lado basolateral para o lado luminal da célula, gerando um gradiente osmótico que fornece a força motriz para a secreção de água pela membrana apical através dos canais de água, aquaporinas que, embora seja uma família de canais com 12 tipos diferentes encontrados na membrana celular (AQP0 – AQP12), nas células das glândulas salivares temos a presença dos tipos 1,3,4,5,6,7,8 e 11, sendo o AQP5 o que desempenha papel fundamental na salivação (AURE; RØED; GALTUNG, 2010; LIU; ONG; AMBUDKAR, 2018).

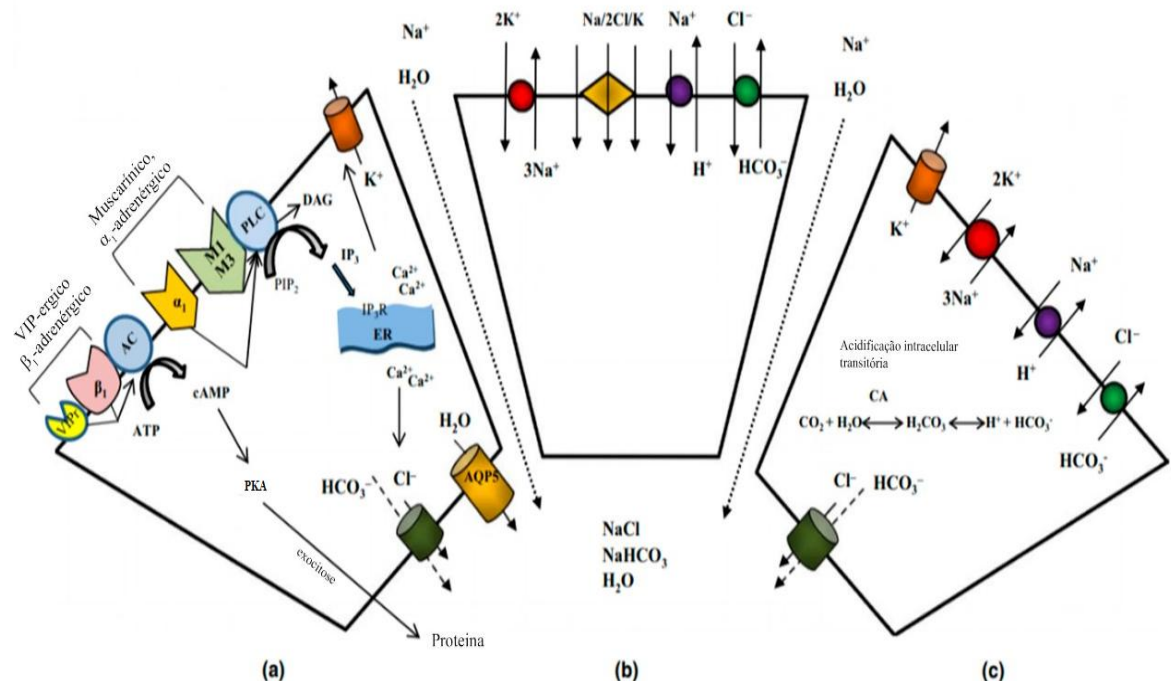


Figura 6 – Modelo de transporte acinar de íons envolvidos na formação do fluido salivar (ver o texto). O setor **(a)** ilustra a cascata decorrente da estimulação dos receptores muscarínicos, adrenérgicos e VIP-érgicos, resultando setor **(b)** mostra a secreção de cloreto para as células acinares

depende de transporte iônico basolateral; o setor **(c)** ilustra a acidificação intracelular transitória causada pelo efluxo de HCO_3^- . Os íons bicarbonato (HCO_3^-) e hidrogênio (H^+) são produzidos pela conversão da anidrase carbônica a partir de CO_2 e H_2O (adaptado de PEDERSEN et al., 2018)

As células acinares ainda expressam receptores β_1 -adrenérgicos, que ligam a norepinefrina liberada da inervação simpática glandular. A estimulação do receptor β_1 -adrenérgico, ao qual está acoplada a proteína Gs, induz a ativação da adenilato ciclase (AC), seguida da produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) que, por meio de eventos de fosforilação, medeia a exocitose de proteínas de células acinares. A ativação dos receptores β_1 -adrenérgicos também pode provocar a secreção de fluidos. O movimento transepitelial de ânions é considerado a principal força motriz da secreção de fluidos.

As condições de repouso das células acinares são rapidamente restabelecidas após o término da estimulação. As concentrações de $[\text{Ca}^{+2}]_i$ são reduzidas ao nível pré-estimulatório pelas Ca^{+2} -ATPases da membrana plasmática, pela bomba de Ca^{+2} -ATPase do retículo sarco/endoplasmático e pelas proteínas de ligação de cálcio. (AURE; RØED; GALTUNG, 2010; PEDERSEN et al., 2018).

A secreção de cloreto para as células acinares depende de transporte iônico basolateral, que em cooperação acumulam Cl^- intracelular acima do equilíbrio. A Na^+/K^+ -ATPase cria um gradiente de sódio dirigido para o interior celular através da membrana basolateral, que fornece energia para esta atividade. O gradiente é utilizado para a captação de cloreto pelo co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ sensível à alça diurética NKCC1 e via paralela acoplada consistindo de um trocador de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolateral (AE2) e um trocador de Na^+/K^+ (NHE1) (PEDERSEN et al., 2018).

Admite-se que o efluxo de HCO_3^- possa contribuir significativamente para a formação da saliva primária, provavelmente através da condutância luminal

semelhante ao que foi descrito acima em relação ao Cl^- ; no entanto, em muitas glândulas salivares a secreção de Cl^- é suficiente para a formação de fluidos.

Após o efluxo de HCO_3^- , a recuperação do pH intracelular é feita pela atividade regulada positivamente do trocador Na^+/H^+ basolateral, que pode utilizar um gradiente estabelecido pela Na^+/K^+ -ATPase para exportar prótons (PEDERSEN et al., 2018).

As glândulas salivares maiores contribuem com a maior secreção de volume e eletrólitos, porém como a qualidade do fluxo é variável, pode dizer-se que a proteção da saliva oferecida por essas glândulas também é variável. Paradoxalmente, mesmo apesar de as glândulas salivares menores contribuírem com menor quantidade de líquido, elas são as mais importantes por causa de seus componentes protetores (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

1.3 Disfunções Salivares

Como mencionado anteriormente, diversas patologias podem ser detectadas por meio de uma análise simples da saliva. Algumas dessas patologias, tanto locais como sistêmicas, podem envolver as glândulas salivares e causar disfunções.

Disfunção de glândula salivar é definida como qualquer alteração quantitativa e/ou qualitativa na produção de saliva (PEDERSEN et al., 2018). A disfunção salivar caracterizada por hipofunção pode ser dividida em três aspectos: xerostomia, que é uma alteração subjetiva na quantidade de saliva produzida; hipossalivação, que é uma redução objetiva do fluxo salivar, e alterações diretas na composição da saliva (SALEH et al., 2015).

A xerostomia, reportada por 5% a 46% da população, é definida como a queixa subjetiva de boca seca, embora a maioria dos pacientes que se queixam de xerostomia não apresentem nenhum sinal objetivo de hipossalivação; de fato,

seus sintomas podem ser secundários a mudanças qualitativas e/ou quantitativas na composição da saliva (VILLA; CONNELL; ABATI, 2014; QUOCK, 2016).

Em geral, as mulheres e os idosos sofrem mais com a xerostomia e têm menores taxas de fluxo salivar do que homens e pessoas mais jovens. A maior incidência em idosos é em princípio devida a um maior número de morbidades e ao uso de maior quantidade de medicamentos nessa faixa etária (PEDERSEN et al., 2018).

Grande quantidade de medicamentos pode levar o paciente a uma hipossalivação e xerostomia, porém raramente fármacos causam danos irreversíveis às glândulas salivares. Anticolinérgicos, antidepressivos tricíclicos, antipsicóticos, anti-histamínicos, descongestionantes, anti-hipertensivos, fármacos citotóxicos, anti-retrovirais, opioides e benzodiazepínicos são alguns exemplos de classes de fármacos que podem levar a uma secura de boca (SALEH et al., 2015).

A síndrome de Sjögren é uma doença autoimune crônica que afeta glândulas exócrinas (incluindo as glândulas salivares), reduzindo a secreção de fluidos. Pacientes com esta síndrome relatam secura em locais como boca e olhos (QUOCK, 2016). Observa-se inflamação das glândulas salivares com consequente desenvolvimento de hipofunção em portadores de doenças autoimunes como artrite reumatoide, lúpus, artrite juvenil idiopática, e cirrose biliar (SALEH et al., 2015).

Pacientes diabéticos também apresentam diminuição da salivação. Este fato pode estar ligado, em parte, ao fato de que a calmodulina presente na glândula salivar sofre glicação excessiva, o que interfere na $[Ca^{2+}]_i$, e consequentemente no mecanismo de exocitose da saliva (NICOLAU; DE SOUZA; CARRILHO, 2009).

O desenvolvimento de hipofunção de glândulas salivares também pode ser devido a uma série de distúrbios neurológicos, metabólicos e genéticos, além

de tratamentos como a radioterapia de cabeça e pescoço (SALEH et al., 2015; PEDERSEN et al., 2018).

Pacientes com hipofunção da glândula salivar podem relatar os seguintes sintomas: secura da mucosa oral e desconforto, lábios rachados, língua que adere ao palato, aderência do alimento aos dentes, sensação de sede com necessidade constante de sorver líquidos, fissuras na língua, halitose, ulcerações na mucosa oral, candidíase, erosões dentárias, dificuldade de mastigação e deglutição, dificuldades na fala, distúrbios de sono, má nutrição, constipação, perda de peso, entre outros. Todos esses problemas afetam diretamente a qualidade de vida podendo causar depressão e isolamento social (PEDERSEN et al., 2018).

O tratamento para a hipossalivação e a xerostomia pode ser preventivo, simpatomimético, tópico, ou regenerativo (SALEH et al., 2015).

Menos comum que a hipofunção, a sialorreia, ou seja, salivação excessiva é ocorrência comum em crianças com deficiências neurológicas ou em adultos, decorrente da doença de Parkinson, acidente vascular cerebral ou consequente a efeitos colaterais adversos de medicamentos. Pode também ser causada por mau controle muscular oral ou facial, má oclusão dentária ou pela hiperfunção das glândulas salivares. É frequentemente estigmatizante e prejudica a qualidade de vida do paciente, podendo ser tratada com medicação, cirurgicamente, radiação ou aplicação de toxina botulínica diretamente nas glândulas salivares (HOCKSTEIN et al., 2004; DANIEL, 2015).

1.4 Sulfeto de hidrogênio (H₂S)

Os primeiros relatos na literatura biomédica sobre o sulfeto de hidrogênio (H₂S) descreviam-no como um gás extremamente tóxico e vinculado a muitas destruições e extinções causadas no planeta (WANG, 2012). De fato, é bíblica a vinculação do enxofre com a destruição ("...o Senhor fez chover enxofre e fogo desde os céus sobre Sodoma e Gomorra." – Gênesis 19:24)

Incolor, mais pesado que o ar, extremamente tóxico e com característico odor de ovo podre, o envenenamento por H₂S é um problema ambiental, devido à disseminação a partir de atividades industriais como fábricas de papel, produção de água pesada, esgotos urbanos e agricultura, para citar apenas algumas das atividades implicadas. H₂S é o contaminante sulfúrico predominante do gás natural; em concentração de 4 ppm já causa dores de cabeça e em doses mais altas pode ser letal (REIFFENSTEIN, 1992).

Dados recentes encontrados na literatura têm demonstrado de forma crescente que o H₂S exerce efeitos fisiológicos atuando como mediador endógeno em diversos sistemas, o que lhe tem garantido uma posição entre os gasotransmissores (GADALLA; SNYDER, 2010). Sabe-se também que não só bactérias, mas também plantas, fungos e humanos são capazes de produzir H₂S (WANG, 2012).

A produção do H₂S endógeno é dependente das enzimas cistationina β-sintase (CBS), cistationina γ-liase (CSE) e 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3MST, WANG, 2012). CBS e CSE são expressas em muitos tecidos como, tecido cardíaco, fígado, rim, sistema nervoso e células do músculo liso e produzem H₂S a partir de cisteína e homocisteína como substrato. A 3-mercaptopiruvato é produzida pela cisteína aminotransferase (CAT) a partir da cisteína e α-cetoglutarato e produz H₂S a partir da 3-mercaptopiruvato sulfotransferase. As enzimas CBS e CSE estão localizadas no citoplasma, enquanto a 3MST encontra-se principalmente nas mitocôndrias (KIMURA, 2011, Figura 7).

Recentemente demonstrou-se que a produção de H₂S via CSE e 3MST pode ser regulada pelo Ca²⁺, sendo que em baixas [Ca²⁺]_i essas enzimas produzem H₂S; entretanto, quando há estímulo celular e a [Ca²⁺]_i é aumentada por influxo, a produção de H₂S via CSE se reduz em aproximadamente 50% ao mesmo tempo que a via 3MST é totalmente interrompida (KIMURA, 2014).

Uma menor quantidade de H₂S é sintetizada por via não-enzimática, por redução de enxofre elementar usando espécies redutoras. A produção de H₂S

por esse caminho é promovida em função da ocorrência de estresse oxidativo e hiperglicemia. O sulfeto via oxidação não-enzimática produz tiosulfato, o qual pode ser convertido em sulfito pela tiosulfato redutase. Os polissulfetos orgânicos derivados do alho induzem a produção de H_2S de maneira dependente de tiol (WANG, 2012, Figura 7).

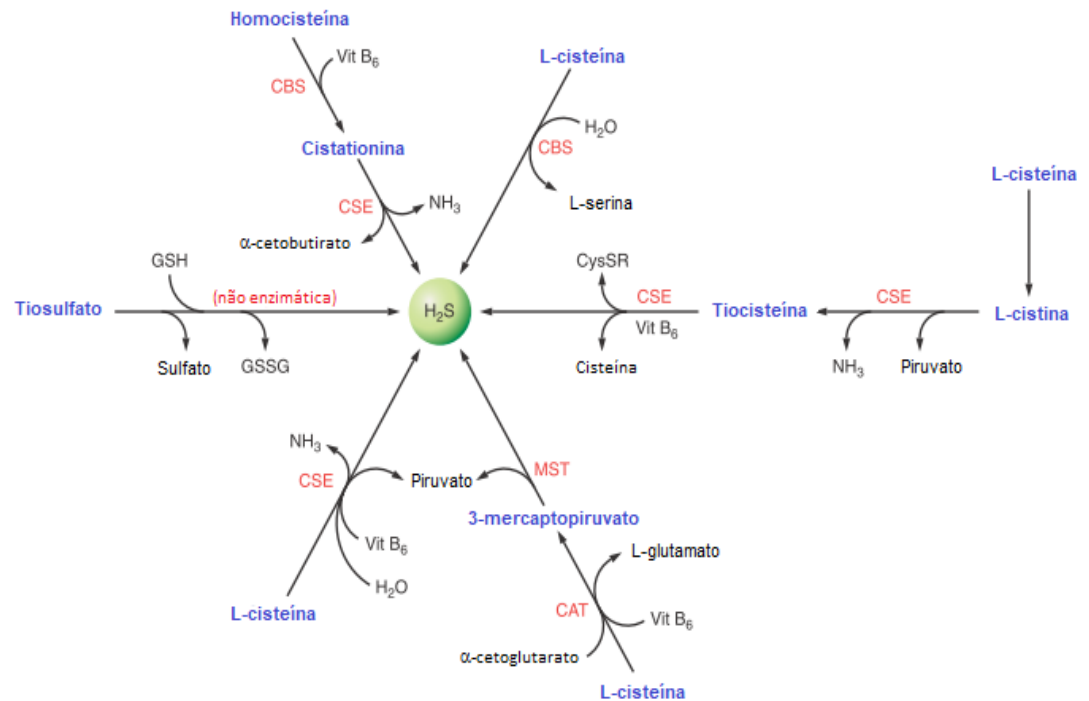


Figura 7 – Biossíntese do H_2S . (adaptado de WANG, 2012).

Muitas pesquisas sobre o H_2S concentram-se nos seus efeitos nos sistemas orgânicos individuais, sendo particularmente relevantes seus efeitos sobre o sistema cardiovascular e na inflamação. Entretanto, muitas outras funções foram postuladas para o H_2S endógeno, por exemplo na periferia e no sistema nervoso central (nocicepção e neurodegeneração), influência no controle de funções gastrintestinais, urogenitais, endocrinológicas e respiratórias, e regulação do estado de contração da íris (LI; ROSE; MOORE, 2011; DUNN et al., 2016).

Estes efeitos estão relacionados à atuação do H_2S sobre seus alvos moleculares. Os quais incluem sulfidação de proteínas ricas em

cistina/cisteína (tio), proteínas de sinalização intracelular e fatores de transcrição, canais iônicos e no metabolismo (efeitos na produção de ATP mitocondrial, figura 8, LI; ROSE; MOORE, 2011).

A concentração plasmática de H₂S varia de 34–65 µM, porém no cérebro a concentração fisiológica de H₂S é até três vezes maior que no soro (OLAS, 2015).

Um dos primeiros efeitos fisiológicos benéficos propostos para o H₂S foi a atuação no tônus vascular e na inflamação. A ação anti-inflamatória está relacionada à sua capacidade de impedir a adesão de leucócitos pela inibição do rolamento de leucócitos e da adesão firme ao endotélio, e inibição significativa de moléculas de adesão leucocitária. A sinalização de H₂S previne também o edema tecidual (POLHEMUS; LEFER, 2014).

Estudos têm demonstrado que a presença de grupos doadores de H₂S em fármacos anti-inflamatórios pode potencializar a ação destes fármacos, além de suprimir os efeitos gástricos deletérios comuns a essa classe de medicamentos (EKUNDI-VALENTIM et al., 2013).

O H₂S atua como um fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF, MUSTAFA et al., 2011). Os primeiros trabalhos neste contexto demonstraram o efeito do H₂S dependente da ativação dos canais K_{ATP} exercendo uma atividade vasorrelaxante (ZHAO et al., 2001). Estudo realizado em aorta de ratos demonstrou que o H₂S é capaz de aumentar o GMPc, o que leva ao relaxamento do vaso (COLETTA et al., 2012). A hiperpolarização pela acetilcolina, que é mediada por canais de potássio de média e pequena condutância, depende da atividade da CSE o que representa a função do H₂S na sinalização da acetilcolina na artéria mesentérica. Os camundongos *knockout* para CSE apresentam hipertensão, exibem disfunção endotelial e são deficientes na indução de hiperpolarização dependente do endotélio, consistente com o papel do H₂S como EDHF (YANG et al., 2008; KABIL; MOTL; BANERJEE, 2014)

O H_2S também é responsável pela modulação de outros canais, como os canais de K^+ dependentes de Ca^{2+} , canais de Ca^{2+} tipo L e tipo T. Como os canais de Ca^{2+} tipo T, quando inativados, promovem relaxamento das células e consequente aumento da luz do vaso, por via de consequência o H_2S torna-se partícipe da manutenção da tonicidade adequada dos vasos sanguíneos e proteção contra o desenvolvimento da hipertensão (OLAS, 2015).

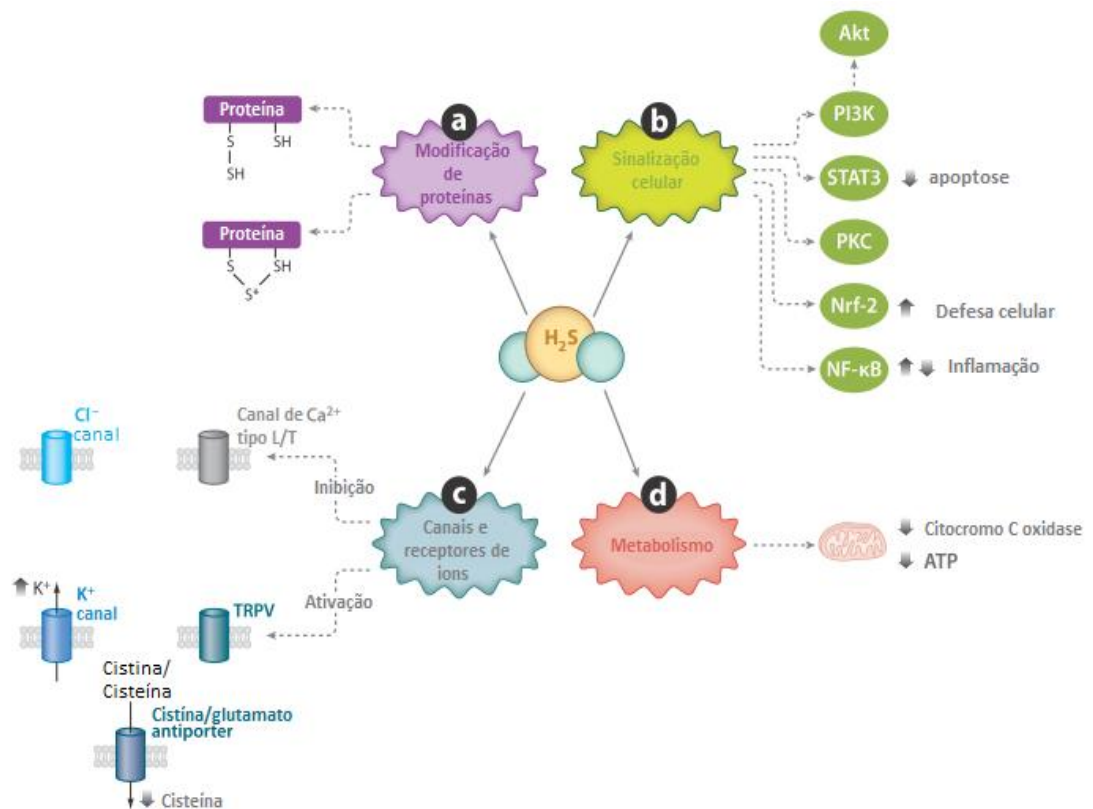


Figura 8 – Alvos moleculares do H_2S . adaptado de LI; ROSE; MOORE, 2011).

Como molécula de sinalização, o H_2S desempenha papel importante na regulação da função do sistema nervoso. No sistema nervoso central, o sulfeto de hidrogênio está envolvido em processos fisiológicos, isto é, neuroproteção e neurotransmissão em vários modelos (OLAS, 2015). Relatou-se que a inalação de H_2S pode ter papel na prevenção da neurodegeneração em modelos de camundongo com doença de Parkinson, potencialmente através da regulação positiva dos mecanismos de defesa antioxidante e inibição da inflamação e apoptose das células cerebrais (KIDA et al., 2010).

O H₂S aumenta a expressão de IL-6 e IL-8 induzidas por LPS em fibroblastos periodontais via ativação da sinalização do fator nuclear kappa B (NF-κB), que pode promover o desenvolvimento de periodontite (OLAS, 2015).

Estudo recente demonstra que o núcleo de células acinares de glândula parótida de ratos apresenta as enzimas CBS e CSE, e que a produção de H₂S nesta glândula pode estar relacionada com o aumento da salivação (MOUSTAFA; HABARA, 2015).

Os doadores sintéticos de H₂S podem ser divididos em diversos grupos, de acordo com os mecanismos e a velocidade de liberação. Sais inorgânicos de sulfeto são um primeiro grupo de doadores, onde se podem incluir o Na₂S (sulfeto de sódio) e o NaHS (hidrosulfeto de sódio). Ambas as substâncias geram rapidamente H₂S de forma espontânea por hidrólise e por esse motivo são denominados “liberadores rápidos” ou “liberadores espontâneos”. Outro grupo são os compostos de natureza orgânica, representados pelo composto morfolino-4-ium-4-metoxifenil fosfinoditioato (GY4137), que quando comparados aos sais de sulfeto, apresentam uma liberação mais lenta de H₂S, e por este motivo são denominados “doadores lentos”. Os fármacos híbridos completam o grupo de doadores de H₂S e como exemplo podem citar-se o 1,2-ditiol-3-tiona (DTT), acoplados a outros fármacos como, por exemplo, anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs, LI; ROSE; MOORE, 2011; WANG, 2012).

Como inibidores da síntese do H₂S mais comumente utilizados, temos a propargilglicina (PAG), β-cianoalanina (BCA) e o ácido aminooxiacético (AOAA), trifluoroalanina e hidroxialamina (HA). A BCA e a PAG são consideradas inibidores específicos para CSE, enquanto o AOAA é frequentemente utilizado como inibidor seletivo de CBS; no entanto, a inibição produzida sobre a enzima CBS não é exclusiva (ASIMAKOPOULOU et al., 2013).

9 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que a produção de H₂S nas glândulas salivares de camundongos é decorrente da atividade das enzimas CSE e 3MST em vista de a presença da enzima CBS não ter sido detectada por ensaios de Western-blotting ou RT-PCR,

Com base nos experimentos de estimulação colinérgica e adrenérgica “*ex vivo*” das glândulas salivares submandibular e sublingual de camundongos na presença de doadores de H₂S e inibidores da sua síntese, podemos afirmar que o H₂S atua como um potencializador do estímulo salivatório desencadeado por essas vias.

Comprovamos ainda que H₂S, por si só, também atua sobre o processo de salivação, induzindo a secreção de α -amilase quando em baixas concentrações e agindo de maneira oposta quando em concentrações acima de 1 μ M.

Com base nos experimentos realizados *ex-vivo*, novos estudos *in-vivo* podem ser realizados a fim de esclarecer se o H₂S é capaz de aumentar o fluxo salivar, além da secreção de α -amilase que já temos comprovada, e assim ser utilizado no tratamento de pacientes que apresentam disfunções salivares como a xerostomia e a hipossalivação.

É ainda interessante a possibilidade de estudar-se a influência do H₂S sobre outros constituintes da saliva como, por exemplo, a mucina, que é um importante protetor contra o desenvolvimento de cáries.

REFERÊNCIAS*

AMANO, O.; MIZOBE, K.; BANDO, Y.; SAKIYAMA, K. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glandsh;Overview of the Japan Salivary Gland Society-Sponsored Workshop; **ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA**,vol. 45 n. 5, p. 241-250, 2012.

ARAUJO, L. C. d. C.; DE SOUZA, I. L. L.; VASCONCELOS, L. H. C.; BRITO, A. de F.; QUEIROGA, F. R.; SILVA, A. S.; DA SILVA, P. M.; DE ANDRADE CAVALCANTE, F. A.; DA SILVA, B. A. Acute aerobic swimming exercise induces distinct effects in the contractile reactivity of rat ileum to KCL and carbachol. **Frontiers in Physiology**, vol. 7, n. 103, p. 1-6, 2016.

ASIMAKOPOULOU, A.; PANOPOULOS, P.; CHASAPIS, C. T.; COLETTA, C.; ZHOU, Z.; CIRINO, G.; GIANNIS, A.; SZABO, C.; SPYROULIAS, G. A.; PAPAPETROPOULOS, A. Selectivity of commonly used pharmacological inhibitors for cystathionine β synthase (CBS) and cystathionine γ lyase (CSE). **British Journal of Pharmacology**, vol. 169, p. 922-932, 2013.

AURE, M. H.; RØED, A.; GALTUNG, H. K. Intracellular Ca²⁺ responses and cell volume regulation upon cholinergic and purinergic stimulation in an immortalized salivary cell line. **European Journal of Oral Sciences**, vol.118, p. 237-244, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol.7, n. 72, p. 248-254, 1976.

BUCCI, M.; PAPAPETROPOULOS, A.; VELLECCO, V.; ZHOU, Z.; PYRIOCHOU, A.; ROUSSOS, C.; ROVIEZZO, F.; BRANCALEONE, V.; CIRINO, G. Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, vol. 30, n.10, p. 1998-2004, 2010.

CASAROSA, P.; KIECHLE, T.; SIEGER, P.; PIEPER, M.; GANTNER, F. The constitutive activity of the human muscarinic M3 receptor unmasks differences in the pharmacology of anticholinergics. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol. 333, n. 1, p. 201-209, 2010.

CICCO, P.; ERCOLANO, G.; RUBINO, V.; TERRAZZANO G.; RUGGIERO G.; CIRINO G.; IARANO A. Modulation of myeloid derived suppressor cells (MDSC) functions a new strategy towards hydrogen sulfide anti-cancer effects. **British Journal of Pharmacology**, doi 10.1111/14824, 2019)

CHI, X. P.; OUYANG, X. Y.; WANG, Y. X. Hydrogen sulfide synergistically upregulates Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced expression of IL-6 and IL-8 via NF- κ B signalling in periodontal fibroblasts. **Archives of Oral Biology**, vol. 59, n. 9, p. 954-961, set., 2014.

CHIAPPIN, S.; ANTONELLI, G.; GATTI, R.; DE PALO, E. F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation **Clinica Chimica Acta**, vol. 383, n 1/2, p. 30-40, ago., 2007. .

CHOJNOWSKA, S.; BARAN, T.; WILIŃSKA, I.; SIENICKA, P.; CABAJ-WIATER, I.; KNAŚ, M. Human saliva as a diagnostic material. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 185–191, 2018.

COAVOY-SÁNCHEZ, S. A.; COSTA, S. K. P.; MUSCARÁ, M. N. Hydrogen sulfide and dermatological diseases **British Journal of Pharmacology**, doi. 10.1111/bph 14699, 2019. .

COAVOY-SÁNCHEZ, S. A.; RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, S. A.; SOARES, A. G.; TORREGROSSA, R.; WOOD, M. E.; WHITEMAN, M.; COSTA, S. K. P.; MUSCARÁ, M. N. Hydrogen sulfide donors alleviate itch secondary to the activation of type-2 protease activated receptors (PAR-2) in mice. **Pharmacological Research**, vol. 113, part A, p. 686-694, nov., 2016.

COLETTA, C.; PAPAPETROPOULOS, A.; ERDELYI, K.; OLAH, G.; MÓDIS, K.; PANOPOULOS, P.; ASIMAKOPOULOU, A.; GERÖ, D.; SHARINA, I.; MARTIN, E.; SZABO, C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol 109, n. 23, p. 9161-9166, jun. 2012.

DANIEL, S. J. Botulinum toxin injection techniques for pediatric sialorrhea. **Operative Techniques in Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, vol. 26, n.1, p. 42-49, 2015.

DAWES, C. A mathematical model of salivary clearance of sugar from the oral cavity. **Caries research**, vol. 17, n. 4, p. 321-334, 1983.

DAWES, C.; PEDERSEN, A. M. L.; VILLA, A.; EKSTRÖM, J.; PROCTOR, G. B.; VISSINK, A.; AFRAMIAN, D.; MCGOWAN, R.; ALIKO, A.; NARAYANA, N.; SIA, Y. W.; JOSHI, R. K.; JENSEN, S. B.; KERR, A. R.; WOLFF, A. The functions of human saliva: A review Sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI **Archives of Oral Biology**, vol. 60, n. 6, p. 863-874, jun., 2015. .

DEL FIACCO, M.; LANTINI, M. S.; SERRA, M. P.; QUARTU, M. Morphological changes induced by neuropeptide in vitro stimulation of the rat parotid gland. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, vol. 115, n. 1/2, p. 59-64, 2010.

DELPORTE, C.; BRYLA, A.; PERRET, J. Aquaporins in salivary glands: From basic research to clinical applications **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 2, n. 17 (2), p. 1-13, jan., 2016. .

DENNY, P. C.; BALL, W. D.; REDMAN, R. S. Salivary glands: A paradigm for diversity of gland development **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, vol. 8, n. 1, p. 51-75, 1997. .

DUNN, W. R.; ALEXANDER, S. P. H.; RALEVIC, V.; ROBERTS, R. E. Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle **Pharmacology and Therapeutics**,

vol. 158, p. 101-113, 2016. .

EKUNDI-VALENTIM, E.; MESQUITA, F. P.; SANTOS, K. T.; DE PAULA, M. A.; FLORENZANO, J.; ZANONI, C. I.; RODRIGUES, L.; DE NUCCI, G.; TEIXEIRA, S. A.; FERREIRA, H. H.; WALLACE, J. L.; COSTA, S. K.; MUSCARÁ, M. N. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H₂S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. **Medical Gas Research**, vol. 24, n.3, p. 1-9, 2013.

ELLIS, H. Anatomy of the salivary glands surgery (**United Kingdom**), 2012. .

GADALLA, M. M.; SNYDER, S. H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter **Journal of Neurochemistry**, vol. 113, n. 1, p. 14-26, abr., 2010. .

GAUTAM, D. Cholinergic Stimulation of Salivary Secretion Studied with M1 and M3 Muscarinic Receptor Single- and Double-Knockout Mice. **Molecular Pharmacology**, vol. 66, n. 2, p. 260-270, ago., 2004.

GIBBINS, H. L.; PROCTOR, G. B.; YAKUBOV, G. E.; WILSON, S.; CARPENTER, G. H. Concentration of salivary protective proteins within the bound oral mucosal pellicle. **Oral Diseases**, vol. 20, n. 7, p. 707-713, out., 2014.

GRESIK, E. W. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. **Microscopy Research and Technique**, vol. 27, n. 1, p. 1-24, jan., 1994.

HARUNAGA, J.; HSU, J. C.; YAMADA, K. M. Dynamics of salivary gland morphogenesis **Journal of Dental Research**, vol. 90, n. 9, p. 1070-1077, 2011.

HELLMICH, M. R.; SZABO, C. Hydrogen sulfide and cancer. **Handbook of Experimental Pharmacology**, vol. 230, p. 233-241, jan., 2015.

HEMADI, A. S.; HUANG, R.; ZHOU, Y.; ZOU, J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment **International journal of oral science**, doi:10.1038/ijos.2017.35, 2017. .

HERRERA, B. S.; COIMBRA, L. S.; DA SILVA, A. R.; TEIXEIRA, S. A.; COSTA, S. K. P.; WALLACE, J. L.; SPOLIDORIO, L. C.; MUSCARA, M. N. The H₂S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. **Medical Gas Research**, doi:[10.1186/s13618-015-0025-3](https://doi.org/10.1186/s13618-015-0025-3), 2015.

HINE, C.; HARPUTLUGIL, E.; ZHANG, Y.; RUCKENSTUHL, C.; LEE, B. C.; BRACE, L.; LONGCHAMP, A.; TREVIÑO-VILLARREAL, J. H.; MEJIA, P.; OZAKI, C. K.; WANG, R.; GLADYSHEV, V. N.; MADEO, F.; MAIR, W. B.; MITCHELL, J. R. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. **Cell**, vol. 160, n. 1/2, p. 132-244, jan., 2015.

HOCKSTEIN, N. G.; SAMADI, D. S.; GENDRON, K.; HANDLER, S. D. Sialorrhea: A management challenge. **American Family Physician**, vol. 69, n. 11, p. 2628-2635, jun., 2004. .

HOLMBERG, K. V.; HOFFMAN, M. P. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands **Monographs in Oral Science**, vol. 24, p. 1-13, 2014. .

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **Journal of Prosthetic Dentistry**, vol. 85, n. 2, p. 162-169, 2001.

JANG, S. I.; ONG, H. L.; GALLO, A.; LIU, X.; ILLEI, G.; ALEVIZOS, I. Establishment of functional acinar-like cultures from human salivary glands. **Journal of Dental Research**, vol. 24, n. 2, p. 304-311, fev., 2015.

KABIL, O.; MOTL, N.; BANERJEE, R. H₂S and its role in redox signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, vol. 1844, n. 8,

p. 1355-1366, 2014. .

KIDA, K.; YAMADA, M.; TOKUDA, K.; MARUTANI, E.; KAKINOHANA, M.; KANEKI, M.; ICHINOSE, F. Inhaled Hydrogen Sulfide Prevents Neurodegeneration and Movement Disorder in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 15, n. 2, p. 343-352, jul., 2010.

KIM, D.; CHEN, J.; MERAM, A.; PATEL, S.; WEI, E.; ANSARI, J.; GHALI, G.; KEVIL, C.; SHACKELFORD, R. E. Hydrogen Sulfide-Synthesizing Enzymes Are Altered in a Case of Oral Cavity Mucoepidermoid Carcinoma. **Case Reports in Oncology**, vol. 31, n. 11, p. 682-687, out., 2018.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 267, n. 1, p. 129-133, jan., 2000.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide: Its production and functions **Experimental Physiology**, vol. 96, n. 9, p. 833-835, set., 2011. .

KIMURA, H. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond **Nitric Oxide. Biology and Chemistry**, vol. 41, p. 4-10, set., 2014. .

KOCHHAR, A.; LARIAN, B.; AZIZZADEH, B. Facial Nerve and Parotid Gland Anatomy **Otolaryngologic Clinics of North America**, vol. 49, n. 2, p. 273-284, abr., 2016. .

KOMINE, N.; SHIMOMURA, H. Characterization of cGMP-related phosphodiesterase isoenzymes in rat salivary glands. **Odontology**, vol. 90, n. 1, pag. 7-12, set., 2002.

KONDO, Y.; MELVIN, J. E.; CATALAN, M. A. Physiological cAMP-elevating secretagogues differentially regulate fluid and protein secretions in mouse submandibular and sublingual glands. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, vol. 316, n. 5, p. 690-697, mai., 2019.

KONDO, Y.; NAKAMOTO, T.; JARAMILLO, Y.; CHOI, S.; CATALAN, M. A.; MELVIN, J. E. Functional differences in the acinar cells of the murine major salivary glands. **Journal of Dental Research**, vol. 94, n. 5, p. 715-721, mai., 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, doi: 10.1038/227680a0 1970.

LAPIS, T. J.; PENNER, M. H.; BALTO, A. S.; LIM, J. Oral digestion and perception of starch: Effects of cooking, tasting time, and salivary α -amylase activity. **Chemical Senses**, v. 42, n. 8, p. 635–645, 2017.

LI, L.; ROSE, P.; MOORE, P. K. Hydrogen Sulfide and Cell Signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 51, p. 169-187, 2011.

LIU, X.; ONG, H.; AMBUDKAR, I. TRP Channel Involvement in Salivary Glands—Some Good, Some Bad. **Cells**, v.74, n.7, p. 1-18, 2018.

MATCZUK, J.; ŻENDZIAN-PIOTROWSKA, M.; MACIEJCZYK, M.; KUREK, K. Salivary lipids: A review. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, vol. 26, n. 6, p. 1021-1029, 2017.

MATSUO, R. Role of Saliva in the Maintenance of Taste Sensitivity. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, vol. 11, n. 2, p. 216-229, 2009.

MINETTI, C. A. S. A.; VALLE, L. B. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; FAVA-DE-MORAES, F. Effects of testosterone and its metabolites in relation to androgen-binding activity in murine submandibular salivary glands. **Archives of Oral Biology**, vol. 30, n. 8, p. 615-619, 1985.

MOUSTAFA, A.; HABARA, Y. Hydrogen sulfide: a novel gaseous signaling molecule and intracellular Ca²⁺ regulator in rat parotid acinar cells . **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, vol. 309, p. 480-490, 2015.

MURRAY, D. R.; MUMMIDI, S.; VALENTE, A. J.; YOSHIDA, T.; SOMANNA, N. K.; DELAFONTAINE, P.; DINARELLO, C. A.; CHANDRASEKAR, B. β 2 adrenergic activation induces the expression of IL-18 binding protein, a potent inhibitor of isoproterenol induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro and myocardial hypertrophy in vivo. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, vol. 52, n. 1, p. 206-218, jan., 2012.

MUSTAFA, A. K.; SIKKA, G.; GAZI, S. K.; STEPPAN, J.; JUNG, S. M.; BHUNIA, A. K.; BARODKA, V. M.; GAZI, F. K.; BARROW, R. K.; WANG, R.; AMZEL, L. M.; BERKOWITZ, D. E.; SNYDER, S. H. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. **Circulation Research**, vol. 109, n. 11, p. 1259-1258, nov., 2011.

NICOLAU, J.; DE SOUZA, D. N.; CARRILHO, M. Increased glycated calmodulin in the submandibular salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry and Function**, vol. 27, p. 193-198, 2009.

NOGUEIRA, F. N.; CARVALHO, R. A. Metabolic remodeling triggered by salivation and diabetes in major salivary glands. **NMR in Biomedicine**, doi: 10.1002/nbm.3683, 2016.

NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review **Biochemia Medica**, vol. 25, n. 2, p. 177-192, jun., 2015.

OLAS, B. Hydrogen sulfide in signaling pathways **Clinica Chimica Acta**, vol.439, p. 212-218, jan., 2015. .

OLIVEIRA-FILHO, R. M.; FAVA-DE-MORAES, F.; MINETTI, C. A. S. A.; MOURA, N. M.; TOLEDO, M. I. Multihormonal control of the muirne submandibular gland. **US/Latin american workshop on salivar research**, p.110-130, 1992

PAPAIOANNOU, V. E.; FOX, J. G. Efficacy of tribromoethanol anesthesia in mice. **Laboratory animal science**, vol. 43, n. 2, p. 189-192, abr., 1993.

PEDERSEN, A. M.; BARDOW, A.; JENSEN, S. B.; NAUNTOFTE, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion **Oral Diseases**, vol. 8, n. 3, p. 117-129, mai., 2002. .

PEDERSEN, A. M. L.; SØRENSEN, C. E.; PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H.; EKSTRÖM, J. Salivary secretion in health and disease **Journal of Oral Rehabilitation**, vol. 45, n. 9, p. 730-746, set., 2018. .

POLHEMUS, D. J.; LEFER, D. J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease **Circulation Research**, vol. 114, n. 4, p. 730-737, fev., 2014. .

PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, vol. 133, n. 1, p. 3-18, abr., 2007. .

PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. Salivary secretion: Mechanism and neural regulation. **Monographs in Oral Science**, vol. 24, p. 14-29, 2014.

QUOCK, R. L. Xerostomia: Current streams of investigation Oral Surgery, **Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, vol. 122, n. 1, p. 53-60, jul., 2016.

REIFFENSTEIN, R. Toxicology Of Hydrogen Sulfide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, vol. 32, p. 109-134, 1992.

ROY, A.; KHAN, A. H.; ISLAM, M. T.; PRIETO, M. C.; MAJID, D. S. A. Interdependency of cystathione γ -lyase and cystathione β -synthase in hydrogen sulfide-induced blood pressure regulation in rats. **American Journal of Hypertension**, vol. 25, n. 1, p. 74-81, jan., 2012.

RUDNEY, J. D. Does variability in salivary protein concentrations influence oral microbial ecology and oral health? **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, vol. 6, n. 4, p. 343-367, out., 1995. .

SALEH, J.; FIGUEIREDO, M. A. Z.; CHERUBINI, K.; SALUM, F. G. Salivary hypofunction: An update on aetiology, diagnosis and therapeutics. **Archives of Oral Biology**, v. 60, n. 2, p. 242–255, fev. 2015.

SANTOS, G. A.; PAULINO, N.; PARDI, P. C. SALIVARY BIOMARKERS FOR THE DETECTION OF ALZHEIMER'S DISEASE. **Alzheimer's & Dementia**, vol. 35, n. 3, p. 864-869, 2017.

SUGANUMA, T.; MAEDA, Y.; KITAHARA, K.; NAGAHAMA, T. Study of the action of human salivary alpha-amylase on 2-chloro-4-nitrophenyl α -maltotrioxide in the presence of potassium thiocyanate. **Carbohydrate Research**, vol. 303, p. 219-227, 1997.

TEOS, L. Y.; ZHANG, Y.; COTRIM, A. P.; SWAIM, W.; WON, J. H.; AMBRUS, J.; SHEN, L.; BEBRIS, L.; GRISIUS, M.; JANG, S. I.; YULE, D. I.; AMBUDKAR, I. S.; ALEVIZOS, I. IP3R deficit underlies loss of salivary fluid secretion in Sjögrens Syndrome. **Scientific Reports**, vol. 14, n. 5, p. 1-14, set., 2015.

VILLA, A.; CONNELL, C. L.; ABATI, S. Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation **Therapeutics and Clinical Risk Management**, vol. 22, n. 11, p. 45-51, dez., 2014. .

WANG, R. Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. **Physiological Reviews**, vol. 92, n.2, p. 791-896, abr., 2012.

WATERMANN, C.; VALERIUS, K. P.; WAGNER, S.; WITTEKINDT, C.; KLUSSMANN, J. P.; BAUMGART-VOGT, E.; KARNATI, S. Step-by-step protocol to perfuse and dissect the mouse parotid gland and isolation of high-quality RNA from murine and human parotid tissue. **BioTechniques**, vol 60, n. 4, p. 200-203,abr., 2016.

WINN-DEEN, E. S.; DAVID, H.; SIGLER, G.; CHAVEZ, R. Development of a direct assay for α -amylase. **Clinical Chemistry**, vol 34, n.10, p.2005-2008, 1988.

YAMAGISHI, R.; WAKAYAMA, T.; NAKATA, H.; ADTHAPANYAWANICH, K.; KUMCHANTUEK, T.; YAMAMOTO, M.; ISEKI, S. Expression and localization of α -amylase in the submandibular and sublingual glands of mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**, vol. 47, n. 3, p. 95-102, jun., 2014.

YAMANISHI, T.; KAGA, K.; FUSE, M.; SHIBATA, C.; KAMAI, T.; UCHIYAMA, T. The role of muscarinic receptor subtypes on carbachol-induced contraction of normal human detrusor and overactive detrusor associated with benign prostatic hyperplasia. **Journal of Pharmacological Sciences**, vol. 128, n. 2, p. 65-70, jun., 2015.

YANG, G.; WU, L.; JIANG, B.; YANG, W.; QI, J.; CAO, K.; MENG, Q.; MUSTAFA, A. K.; MU, W.; ZHANG, S.; SNYDER, S. H.; WANG, R. H₂S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine γ -lyase. **Science**, vol. 322, n. 5901, p. 587-90, out., 2008.

ZHANG, C. Z.; CHENG, X. Q.; LI, J. Y.; ZHANG, P.; YI, P.; XU, X.; ZHOU, X. D. Saliva in the diagnosis of diseases **International Journal of Oral Science**, vol. 8, n. 3, p. 133-137, set., 2016. .

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; WANG, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. **EMBO Journal**, vol. 20, n. 21, p. 6008-6016, nov., 2001.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.