



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Nathália Medeiros Nehme

**Análises em amostras de saliva de ratos *Wistar* machos: ácido úrico,
glutathione reduzida e corticosterona em diferentes idades**

Rio de Janeiro

2023

Nathália Medeiros Nehme

Análises em amostras de saliva de ratos *Wistar* machos: ácido úrico, glutathiona reduzida e corticosterona em diferentes idades

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes
Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N395 Nehme, Nathália Medeiros.
Análises em amostras de saliva de ratos Wistar machos: ácido úrico, glutathione reduzida e corticosterona em diferentes idades / Nathália Medeiros Nehme. – 2023.
94 f.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes
Coorientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Saliva – Fisiologia – Teses. 2. Saliva – Análise e química – Teses. 3. Plasma – Fisiologia. 4. Ácido úrico – Análise – Teses. 5. Corticosterona – Sangue – Teses. I. Lopes, Gustavo Casimiro. II. Lisboa, Patrícia Cristina. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 612.313

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Nathália Medeiros Nehme

Análises em amostras de saliva de ratos *Wistar* machos: ácido úrico, glutathione reduzida e corticosterona em diferentes idades

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2023.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Casimiro Lopes

Instituto de Educação Física e Desportos – UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Dra. Iala Milene Bertasso

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Dra. Carolyne Pimentel Rosado

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Helena Naly Miguens Rocha

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse meu trabalho aos meus pais, Antonio e Marta, e aos meus irmãos, Douglas e Dyego. Sem o suporte de vocês nada disso seria possível!

Dedico também às tantas mulheres que vieram antes de mim, lutaram e desbravaram os caminhos da Ciência e permitiram que, desde 2016, eu pudesse estar trilhando esse caminho.

AGRADECIMENTOS

Antonio e Marta, pais, nenhuma palavra será suficiente pra agradecer por tudo que fazem por mim! Por desde sempre me incentivarem a estudar e por dedicarem suas vidas a proporcionar um dos grandes privilégios que posso ter: educação de qualidade. Obrigada por lutarem por mim e comigo, por dividirem o peso que carrego, por serem os melhores pais que eu poderia ter! Que eu possa orgulhá-los e que, todos os dias, eu consiga demonstrar o quanto vocês são importantes pra mim.

Douglas e Dyego, meus Cristais! Toda a minha sorte eu gastei quando Deus colocou vocês comigo por aqui. Vocês são a minha verdade! Ter vocês comigo quando criança era um privilégio. Depois de adulta, nem se fala... Que possamos nos entender, desentender, reconectar quantas vezes forem possíveis até o finzinho das nossas vidas! Obrigada! Obrigada pela cervejinha gelada num pagode, pelos abraços sinceros comemorando um título do Flamengo, por dias banais compartilhados, pelas lágrimas e abraços dolorosos, por relembrares o meu valor sempre que esqueço. Obrigada por serem vocês mesmo quando não tô merecendo! Viver é muito mais fácil e leve com vocês.

Tia Cristina, obrigada por ser meu colo desde que eu nasci! Obrigada por assumir um lugar tão importante e único na minha vida. Por dividir com meus pais o peso da minha educação. Por cuidar tão bem de mim, por estar sempre pronta a ouvir minhas inúmeras desilusões amorosas, minhas gracinhas e, principalmente, por me fazer virar essa pagodeira. Obrigada por tanto há 27 anos!

Professor Gustavo Casimiro, obrigada por abrir as portas do LAFE sem me conhecer e pelas oportunidades acadêmicas que me proporcionou. Esses 4 anos me proporcionaram um grande crescimento pessoal e, principalmente, como pesquisadora. Obrigada por entender o novo caminho que minha vida acadêmica tomou no mestrado e por apoiar minha decisão. Aos companheiros de LAFE, sobretudo, Alanna, Bruno, Pedro e Vinícius, obrigada pelas jornadas compartilhadas desde 2019!

Professora Patrícia Lisboa, obrigada é muito pouco diante do crescimento, aprendizado e oportunidades que a senhora me proporcionou em 2022. Obrigada por ter aceitado ser minha coorientadora e por ter aberto as portas do LFE! A senhora me inspira a ser uma grande pesquisadora, orientadora e professora. Espero e torço para que seja o primeiro de muitos anos de parceria e trocas dentro e fora do laboratório. Obrigada por acreditar e confiar em mim e no meu trabalho!

Beatriz (Biboca, só pra mim), Fabiana, Iala, Luana e Rosi, equipe de ouro do LFE, qualquer coisa que eu escrever aqui é pouco diante do tanto que vocês foram essenciais pra eu concluir o mestrado. Vocês todas, cada uma com seu jeitinho, pegaram na minha mão assim que entrei toda tímida pela porta do LFE em março/2022. Obrigada por tudo que fizeram e fazem por mim! Espero sempre demonstrar o quanto sou grata por ter cruzado com vocês por esse caminho, vocês me inspiram!

Ulisses e todos os alunos de Iniciação de Científica do LFE, obrigada, obrigada e obrigada! Obrigada por toda ajuda durante os experimentos, por todo carinho e cuidado com meus filhos que vocês tiveram, vocês já são padrinhos de vários ratinhos. E obrigada por deixarem os dias de trabalho mais leves! Contem sempre comigo para o que precisarem – qualquer 10 reais paga meu serviço.

A vida só faz sentido quando ela é compartilhada e eu sou muito grata ao universo por tantas pessoas incríveis que cruzaram o meu caminho, me ajudam a deixar tudo mais leve e dividem o peso da caminhada. Alanna e Pedro, amigos queridos que o LAFE me presenteou e que dividem bons momentos comigo. Ana Luiza, Kethely e Rebecca, amigas da faculdade que viraram família e que permanecem mesmo de longe. Anninha, Carol, Gaby e Karina, amigas de academia que se tornaram essenciais nos meus dias. Natália e Thaísa, amigas de escola que dividi a infância, a adolescência e ainda permanecem na fase adulta. A vida é boa demais com vocês comigo!

E, para finalizar do jeito Nathália, igual terminei o agradecimento na minha monografia, gostaria de fazer um agradecimento especial ao Flamengo e aos cantores de pagode por serem minha válvula de escape para relaxar. Contando as horas para, além de ser uma grande Biomédica Rubro-Negra Pagodeira, ser uma grande Mestre Biomédica Rubro-Negra Pagodeira.

RESUMO

NEHME, Nathália Medeiros. **Análises em amostras de saliva de ratos *Wistar* machos:** ácido úrico, glutathione reduzida e corticosterona em diferentes idades. 2023. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A saliva é um fluido aquoso composto por uma mistura de componentes orgânicos e inorgânicos que desempenha as seguintes funções: lubrificação e proteção da cavidade bucal; atividade tamponante e limpeza; manutenção da integridade dos dentes; atividade antimicrobiana e imunológica; atuação na digestão de amido e percepção de sabor. Sua síntese é realizada pelas glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais e é controlada pelo sistema nervoso autônomo, com expressiva ação do parassimpático. A maioria dos compostos orgânicos são sintetizados no local, enquanto outros atingem a saliva a partir do sangue. A avaliação salivar é utilizada em humanos para investigação de marcadores de diagnóstico de doenças locais e sistêmicas. Em roedores, a literatura é escassa no que diz respeito a avaliação de marcadores salivares e sua correlação com o plasma. O objetivo desse trabalho foi padronizar a coleta de saliva em ratos *Wistar* machos em 3 diferentes idades e realizar a dosagem de ácido úrico, glutathione reduzida (GSH) e corticosterona. Animais provindos de 15 ninhadas (45 animais), foram aleatoriamente escolhidos para serem sacrificados nas seguintes idades: 35 dias (Grupo 35; n = 15); 60 dias (Grupo 60; n = 15) e 90 dias (Grupo 90; n = 15). Para a padronização da coleta de saliva, foram realizados testes com a administração de pilocarpina em diferentes doses para alcançar concentração eficaz e segura para o animal. O animal foi anestesiado com xilazina (5 mg/kg pc) e ketamina (20 mg/kg pc) e, em seguida, foi administrado pilocarpina (1,25 mg/kg pc + diluição com 200% no volume de solução salina). Após a queda da 1ª gota de saliva, o procedimento foi mantido por 15 minutos, e a amostra foi transferida para um microtubo de centrifugação. Ácido úrico, glutathione reduzida e corticosterona foram dosados na saliva e no plasma dos animais. A concentração de ácido úrico salivar no grupo 60 foi 82% maior que o grupo 35 ($p = 0,0057$, diferença média = -0,2321) e no plasma, no grupo 90 foi 46% menor do que o grupo 60 ($p = 0,0119$, diferença média = -1,088). A concentração de GSH salivar do grupo 60 foi menor do que os grupos 35 e 90 (56% , $p = 0,0264$, diferença média = 2,206; 59%, $p = 0,0101$, diferença média = -2,522, respectivamente), no plasma foi 65% menor no grupo 60 do que no grupo 35 ($p = 0,0075$, diferença média = 4,128). A corticosterona salivar foi 81% e 84% menor no grupo 60 e 90 comparados ao grupo 35, respectivamente ($p < 0,0001$, diferença média = 5,512; $p < 0,0001$, diferença média = 5,657, respectivamente), no plasma foi 92% maior no grupo 90 comparado ao grupo 60 ($p = 0,0010$, diferença média = 203,3). Foi observada correlação entre os marcadores salivares ácido úrico e corticosterona no grupo 60. Nesse trabalho, desenvolvemos um protocolo pouco invasivo para coleta de saliva em ratos eutróficos de diferentes idades, possibilitando que novos estudos investiguem o perfil salivar não só em animais saudáveis, mas em modelos experimentais de diferentes alterações metabólicas.

Palavras-chave: Coleta de saliva. Ratos eutróficos. GSH. Ácido úrico. Corticosterona.

ABSTRACT

NEHME, Nathália Medeiros. **Analyzes of saliva samples from male *Wistar* rats: uric acid, reduced glutathione and corticosterone at different ages.** 2023. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Saliva is an aqueous fluid composed of a mixture of organic and inorganic components that has the following functions: lubrication and protection of the oral cavity; buffering activity and cleaning; maintenance of the integrity of the teeth; antimicrobial and immunological activity; starch digestion and taste perception. Its synthesis is carried out by the parotid, submandibular and sublingual glands and is controlled by the autonomic nervous system, with significant parasympathetic action. Most organic compounds are synthesized locally, while others reach the saliva from the blood. Salivary evaluation is used in humans to investigate markers for the diagnosis of local and systemic diseases. In rodents, the literature is scarce regarding the evaluation of salivary markers and the correlation with plasma. Our aim was to standardize saliva collection in male *Wistar* rats at 3 different ages and measure uric acid, reduced glutathione (GSH) and corticosterone. Animals provided from 15 litters (45 animals) were randomly chosen to be sacrificed at the following ages: 35 days (Group 35; n = 15); 60 days (Group 60; n = 15) and 90 days (Group 90; n = 15). To standardize saliva collection, tests were performed with the administration of pilocarpine in different doses to reach an effective and safe concentration. The animal was anesthetized with xylazine (5 mg/kg bw) and ketamine (20 mg/kg bw) and then pilocarpine (1.25 mg/kg bw + dilution with 200% saline by volume) was administered. After the fall of the 1st drop of saliva, the procedure was maintained for 15 minutes, and the sample was centrifuged. Uric acid, reduced glutathione and corticosterone were measured in the animals' saliva and plasma. Salivary uric acid concentration in group 60 was 82% higher than group 35 ($p = 0.0057$, mean difference = -0.2321) and plasma uric acid concentration in group 90 was 46% lower than group 60 ($p = 0.0119$, mean difference = -1.088). Salivary GSH concentration of group 60 was lower than that of groups 35 and 90 (56% , $p = 0.0264$, mean difference = 2.206; 59%, $p = 0.0101$, mean difference = -2.522, respectively), in plasma was 65% lower in group 60 than in group 35 ($p = 0.0075$, mean difference = 4.128). Salivary corticosterone was 81% and 84% lower in group 60 and 90 compared to group 35, respectively ($p < 0.0001$, mean difference = 5.512; $p < 0.0001$, mean difference = 5.657, respectively), in plasma it was 92% higher in group 90 compared to group 60 ($p = 0.0010$, mean difference = 203.3). A correlation between salivary uric acid and corticosterone in group 60 was observed. Here, we developed a minimally invasive protocol for saliva collection in eutrophic rats of different ages, allowing further studies to investigate the salivary profile, not only in healthy animals, but also in experimental models of different metabolic alterations.

Keywords: Saliva collection. Eutrophic rats. GSH. Uric acid. Corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das glândulas salivares maiores.....	20
Figura 2 - Secreção e reabsorção de íons na saliva	22
Figura 3 - Inervação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático.....	23
Figura 4 - Inervação simpática e parassimpática nas glândulas salivares	25
Figura 5 - Efeitos do SNA simpático e parassimpático sobre a secreção da célula acinar	27
Figura 6 - Estrutura molecular da pilocarpina	28
Figura 7 - Mecanismos de transporte de substâncias do sangue para saliva	30
Figura 8 - Localização das glândulas salivares em roedores.....	32
Figura 9 - Método de coleta de saliva em plataforma inclinada.....	35
Figura 10 - Síntese do ácido úrico	43
Figura 11 - Estrutura molecular da GSH	45
Figura 12 - Reação de síntese da glutathiona reduzida	46
Figura 13 - Ciclo de regeneração de GSH.....	48
Figura 14 - Síntese de cortisol	49
Figura 15 - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.....	51
Figura 16 - Fase oxidativa da via das pentoses-fosfato	54
Figura 17 - Animal posicionado para coleta de saliva.....	61
Figura 18 - Secreção salivar formada para coleta.....	61
Figura 19 - Animal posicionado para coleta de saliva.....	62

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Consumo alimentar diário nas idades de 35, 60 e 90 dias	65
Gráfico 2 - Peso corporal nas idades de 35, 60 e 90 dias	66
Gráfico 3 - Comprimento nasoanal nas idades de 35, 60 e 90 dias	67
Gráfico 4 - Glicemia nas idades de 35, 60 e 90 dias	67
Gráfico 5 - Peso absoluto e relativo de TAB retroperitoneal nas idades de 35, 60 e 90 dias...	68
Gráfico 6 - Peso absoluto e relativo de TAB mesentérico nas idades de 35, 60 e 90 dias	69
Gráfico 7 - Peso absoluto e relativo de TAB epididimal nas idades de 35, 60 e 90 dias	70
Gráfico 8 - Peso absoluto e relativo do TAM nas idades de 35, 60 e 90 dias	71
Gráfico 9 - Concentração de ácido úrico salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias	72
Gráfico 10 - Concentração de ácido úrico plasmático nas idades de 35, 60 e 90 dias	73
Gráfico 11 - Concentração de GSH salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias	73
Gráfico 12 - Concentração de GSH plasmática nas idades de 35, 60 e 90 dias	74
Gráfico 13 - Concentração de corticosterona salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias	75
Gráfico 14 - Concentração de corticosterona salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Funções da saliva e seus componentes.....	19
Quadro 2 - Principais espécies reativas e sua atividade	38
Quadro 3 - Principais antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Correlação entre os marcadores salivares e plasmáticos no grupo 35	76
Tabela 2 - Correlação entre os marcadores salivares e plasmáticos no grupo 60	76
Tabela 3 - Correlação entre os marcadores salivares e plasmáticos no grupo 90	77
Tabela 4 - Correlação saliva e plasma no grupo 35.....	78
Tabela 5 - Correlação saliva e plasma no grupo 60.....	78
Tabela 6 - Correlação saliva e plasma no grupo 90.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ACh	Acetilcolina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
DAG	Diacilglicerol
DHBS	Ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzeno sulfonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ER	Espécies reativas
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IP ₃	Inositol trifosfato
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADP ⁺	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidado
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
PBS	Tampão fosfato-salino
PKC	Proteína quinase C
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SOD	Superóxido dismutase

TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
B	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
Cm	Centímetro
rpm	Rotações por minuto
A	Alfa
°C	Graus Celsius
H	Hora
min	Minuto
μL	Microlitro
M	Molar
Ca ²⁺	Íon de cálcio
K ⁺	Íon de potássio
Na ⁺	Íon de sódio
HCO ₃ ⁻	Ânion bicarbonato
O ₂ ·	Radical superóxido
HO ₂ ·	Radical hidroperoxila
OH·	Radical hidroxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
¹ O ₂	Oxigênio singlet
Mg ⁺²	Íon de Magnésio
mM	Milimolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	56
1.1	Geral	56
1.2	Específicos	56
2	MATERIAL E MÉTODOS	57
2.1	Ética e modelo experimental.....	57
2.2	Padronização da coleta de saliva	57
2.3	Eutanásia e coleta de tecidos.....	62
2.4	Análises bioquímicas	63
2.4.1	<u>Ácido úrico</u>	63
2.4.2	<u>Glutathione reduzida</u>	63
2.4.3	<u>Corticosterona</u>	64
2.5	Análises estatísticas	64
3	RESULTADOS	65
3.1	Consumo alimentar	65
3.2	Peso corporal	65
3.3	Comprimento nasoanal	66
3.4	Glicemia	67
3.5	Depósitos de gordura	68
3.5.1	<u>Peso de tecido adiposo branco retroperitoneal</u>	68
3.5.2	<u>Peso de tecido adiposo branco mesentérico</u>	69
3.5.3	<u>Peso de tecido adiposo branco epididimal.....</u>	70
3.5.4	<u>Peso de tecido adiposo marrom</u>	71
3.6	Ácido úrico	72
3.6.1	<u>Ácido úrico salivar</u>	72
3.6.2	<u>Ácido úrico plasmático</u>	72
3.7	Glutathione reduzida	73
3.7.1	<u>Glutathione reduzida salivar</u>	73
3.7.2	<u>Glutathione reduzida plasmática</u>	74
3.8	Corticosterona	74

3.8.1	<u>Corticosterona salivar</u>	74
3.8.2	<u>Corticosterona plasmática</u>	75
4	DISCUSSÃO	80
	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética	94

INTRODUÇÃO

SALIVA

A saliva é um fluido aquoso composto por uma mistura de componentes orgânicos e inorgânicos. Essa secreção tem caráter exócrino mucosseroso com pH variando entre 6,0 e 7,0 e, por isso, levemente ácido (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; ORIÁ; BRITO, 2016). Sua síntese é resultado da mistura de fluidos secretados por três pares principais de glândulas salivares maiores: parótida, submandibular e sublingual. Associado a isso, inúmeras pequenas glândulas salivares distribuídas pela cavidade bucal complementam essa secreção. Assim, esse conjunto de glândulas contribuem para que um indivíduo adulto secrete, aproximadamente 0,5 litro de saliva por dia, em resposta à estímulos originados pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático (FALCÃO *et al.*, 2013).

Composição salivar

A saliva é composta por 99% de água, entretanto, apresenta viscosidade que fornece diferença importante das características físicas da água. Tal característica é devido a presença de glicoproteínas denominadas mucinas. Essas são sintetizadas pelas glândulas submandibular, sublingual e glândulas menores, formando um revestimento de caráter viscoso e viscoelástico na superfície da cavidade oral (DAWES *et al.*, 2015).

Os componentes orgânicos presentes na saliva são as proteínas, dentre as quais a principal é a enzima amilase salivar. Essa é responsável pela digestão inicial dos carboidratos ao hidrolisar as ligações α [1,4]-glicosídicas no interior das cadeias polissacarídicas (DE MELLO AIRES, 2018). Sua presença é notada, principalmente, na saliva proveniente da glândula parótida e em menor concentração na saliva sintetizada pelas glândulas submandibular e sublingual (OSÓRIO *et al.*, 2000; DAWES *et al.*, 2015). Além dessa, há a presença de outras enzimas, imunoglobulinas – sendo a IgA secretória a predominante, vestígios de albumina, poli e oligopeptídeos de importância para a manutenção da saúde bucal, lisozima e lactoferrina que vão atuar impedindo o crescimento bacteriano (OSÓRIO *et al.*, 2000). Os componentes inorgânicos mais comuns são o sódio, potássio, cloro e o bicarbonato que irão fornecer as características osmóticas da saliva (CARPENTER, 2013). Além desses, há a presença de células epiteliais descamadas, microorganismos, produtos

originados do metabolismo bacteriano, resíduos alimentares, leucócitos, além do muco proveniente tanto da cavidade nasal quanto da faringe (FALCÃO *et al.*, 2013).

Os componentes presentes na saliva, geralmente, apresentam-se em pequenas quantidades e podem variar com a ocorrência de mudanças no fluxo salivar. Além disso, esses compostos, sobretudo, as proteínas, podem atuar de forma multifuncional, ou seja, desempenhando mais de uma função, e de forma redundante – executando atividades semelhantes, mas de formas distintas (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Ressalta-se, por isso, que a composição da saliva possui grande relação com as funções que esse fluido assume no organismo.

Função salivar

A função da saliva pode ser categorizada em 5 principais atividades que possuem o intuito de realizar, sobretudo, a manutenção da saúde bucal, criando um ambiente equilibrado e adequado (Quadro 1). Essas 5 funções são: lubrificação e proteção da cavidade bucal; atividade tamponante e limpeza; manutenção da integridade dos dentes; atividade antimicrobiana e imunológica; atuação na digestão e percepção de sabor (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; FALCÃO *et al.*, 2013; ORIÁ; BRITO, 2016).

A lubrificação e proteção da cavidade bucal são conferidas, principalmente, pelas mucinas. Suas propriedades de baixa solubilidade, alta viscosidade e elasticidade fornecem uma película glicoproteica que recobre e protege os tecidos orais, funcionando como barreira contra espécies irritantes (OSÓRIO *et al.*, 2000).

A presença de bicarbonato, fosfato, ureia e substâncias anfóteras conferem à saliva sua função como tampão. O bicarbonato é o componente mais importante desse sistema que, ao difundir-se pela placa, tem a capacidade de neutralizar substâncias ácidas. Essa ação no controle do pH salivar está também relacionada com a manutenção da integridade dos dentes. A saliva previne a desmineralização do esmalte do dente devido à presença e atuação dos íons cálcio, fosfato e flúor, sendo complementada pela capacidade tampão (OSÓRIO *et al.*, 2000; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

O fluido salivar apresenta grande número de peptídeos e proteínas que conferem efeitos antibacterianos, antifúngicos e antivirais. A presença de diversas aglutininas bacterianas possibilitam que haja facilidade na remoção dos microorganismos pela deglutição, além de inibir sua fixação em superfícies orais. Há ainda a presença de lactoferrina e lisozima que atuam inibindo as atividades metabólicas de diversos microorganismos patogênicos

podendo, ainda, danificar a parede celular microbiana (DAWES *et al.*, 2015). O conteúdo imunológico da saliva é conferido pela presença de IgA, IgG e IgM secretoras, sendo a IgA secretora a maior representante do sistema imune. Ela é produzida nos tecidos conjuntivos e translocada para a saliva através das células dos ductos das glândulas salivares maiores e menores. Além disso, pequenas quantidades de IgG e IgM podem alcançar a saliva através das fendas gengivais (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Quadro 1 - Funções da saliva e seus componentes

Função	Efeito	Componente
Proteção	Lubrificação da boca, orofaringe e esôfago	Glicoproteínas
	Impermeabilização	
	Lavagem	Água
	Formação de película	
Tamponamento	Manutenção do pH inadequado para colonização de microorganismos	Fosfato, bicarbonato e proteínas
	Neutralização da acidez	
Digestão	Formação do bolo alimentar	Mucina e água
	Digestão de amido	Amilase salivar
Gustação	Solubilização de moléculas	Água
	Maturação de botões gustativos	Gustina e íons de zinco
Ação antimicrobiana	Barreira	Glicoproteínas
	Anticorpos	IgA, IgG, IgM
	Antagonismo bacteriano	Lisozima e lactoferrina
Integridade do dente	Maturação do esmalte	Cálcio e fosfato
	Proteção contra desmineralização	Mucina, fosfato e cálcio

Fonte: Adaptado de FALCÃO *et al.*, 2013

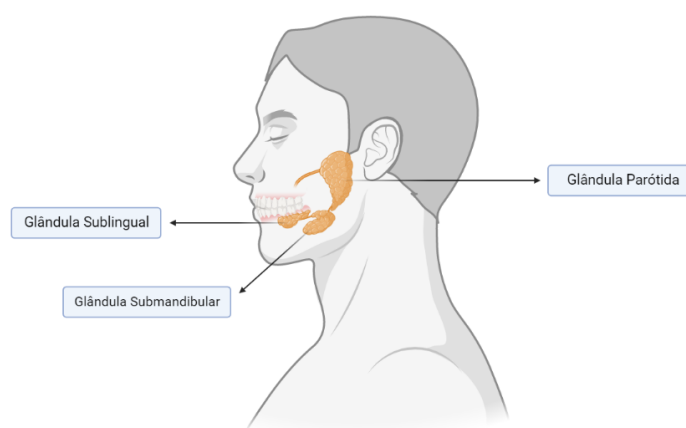
A saliva auxilia na formação do bolo alimentar coeso e coberto de mucina que facilitará o processo de deglutição, além de possuir em sua composição a enzima amilase salivar, responsável pela digestão inicial de carboidratos. Ademais, a saliva propicia a distribuição dos sabores aos vários receptores gustativos presentes na cavidade bucal. Em

ordem de eficácia, os gostos básicos azedo, salgado, amargo, doce e umami funcionam, ainda, como estimulantes salivares (CARPENTER, 2013; DAWES et al., 2015).

Anatomia das glândulas salivares

A saliva é secretada pelas glândulas salivares maiores ou principais: parótida, submandibular e sublingual, e pelas glândulas menores ou acessórias localizadas difusamente na cavidade oral. Em relação à sua localização (Figura 1), a glândula parótida encontra-se adjacente ao maxilar e ao ramo da mandíbula e, as glândulas submandibular e sublingual, na parte inferior da cavidade bucal. Há ainda a participação das glândulas salivares menores que encontram-se distribuídas pelas bochechas, faringe, lábio inferior, língua e palato (BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016).

Figura 1 - Localização das glândulas salivares maiores



Fonte: A autora, 2022 – Criado em Biorender.com

As glândulas salivares são caracterizadas por uma série de ductos ramificados de formato tubular que tem como porção terminal uma região secretora denominada ácino (ORIÁ; BRITO, 2016). As células acinares determinam as características da secreção sintetizada por cada glândula, podendo ser serosa, mucosa ou mista (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). As células serosas têm como característica a secreção de conteúdo seroso rico em enzimas, importante no processo digestivo de moléculas. Enquanto as células mucosas produzem secreção abundante em glicoproteínas, sendo responsável pela

lubrificação e proteção dos tecidos da cavidade oral (BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016).

A glândula parótida é constituída, quase de forma exclusiva, por unidades secretoras acinosas com células serosas e, por isso, produz secreção aquosa abundante em enzimas e anticorpos. Já a glândula submandibular é composta tanto por glândulas serosas quanto mucosas e, mesmo que a proporção entre elas possa variar entre os lóbulos e os indivíduos, a quantidade de estruturas serosas é maior. Assim, a saliva sintetizada nessa região é de composição mista. A glândula sublingual possui, predominantemente, unidades secretoras tubulosas com células mucosas produzindo secreção salivar viscosa. A saliva secretada pelas glândulas salivares menores é rica em muco, proteínas antibacterianas e imunoglobulinas (CARPENTER, 2013; ORÍÁ; BRITO, 2016).

As glândulas salivares maiores são responsáveis pela produção de 85% da saliva, na proporção de 65 a 70% proveniente da glândula submandibular, 20% da glândula parótida e 7 a 8% da glândula sublingual, enquanto as glândulas menores sintetizam menos de 10% (ORÍÁ; BRITO, 2016). Entretanto, quando há a estimulação do fluxo salivar, há modificação na participação dessas glândulas, com a parótida contribuindo com mais de 50% da secreção salivar (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Fisiologia e síntese salivar

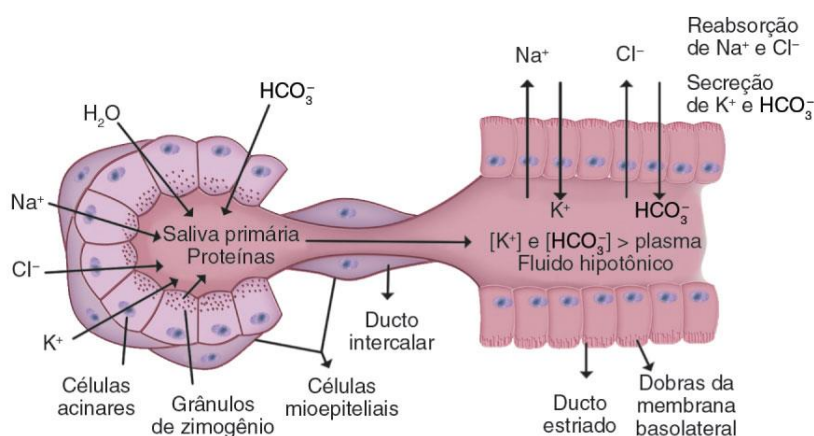
A secreção salivar é um processo que ocorre em duas etapas: a primeira delas é a secreção de saliva pelos ácinos, enquanto a segunda consiste na troca de íons que ocorre posteriormente nos ductos salivares. O conteúdo sintetizado inicialmente pelos ácinos pode ser denominado de saliva primária. Essa é abundante em água, eletrólitos, enzimas e muco e, ao ser transportada pelos ductos, passa por um processo de modificação na sua composição iônica (BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016).

A estrutura da secreção salivar, além das glândulas, é composta por uma rede de ductos que são responsáveis tanto pelo transporte da saliva, quanto por modificações após sua síntese. Há três tipos de ductos: intercalados, estriados e excretores. Os ductos intercalares são os primeiros a receber as secreções sintetizadas pelos ácinos. Nessa região, a saliva não é modificada. Em seguida, o fluido passa pelo ducto estriado, onde ocorre a reabsorção de sódio (Figura 2). Por fim, no ducto excretor, há reabsorção de sódio e secreção de potássio. Essa região é a última a receber a saliva antes de atingir a cavidade oral. Observa-se, ainda, as

células mioepiteliais que localizam-se em torno dos ácinos, que ao se contraírem secretam o conteúdo presente no interior dos ácinos (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Na membrana basolateral das células dos ductos, há também a reabsorção de cloro e secreção de bicarbonato. Por isso, após os processos de reabsorção e secreção de eletrólitos observados ao longo dos ductos estriados e excretores, a saliva final é, normalmente, hipotônica. Essa característica pode ser alterada de acordo com o fluxo salivar. Com o fluxo mais alto, a saliva é pouco reabsorvida, tornando-se abundante em sódio e cloro, enquanto escassa em potássio. Junto a isso, há o aumento da concentração de bicarbonato. Com o fluxo reduzido, o inverso é observado. Esse processo de secreção e reabsorção de eletrólitos é regulado pelo sistema nervoso autônomo e pelos mineralocorticoides (ORIÁ; BRITO, 2016).

Figura 2 - Secreção e reabsorção de íons na saliva

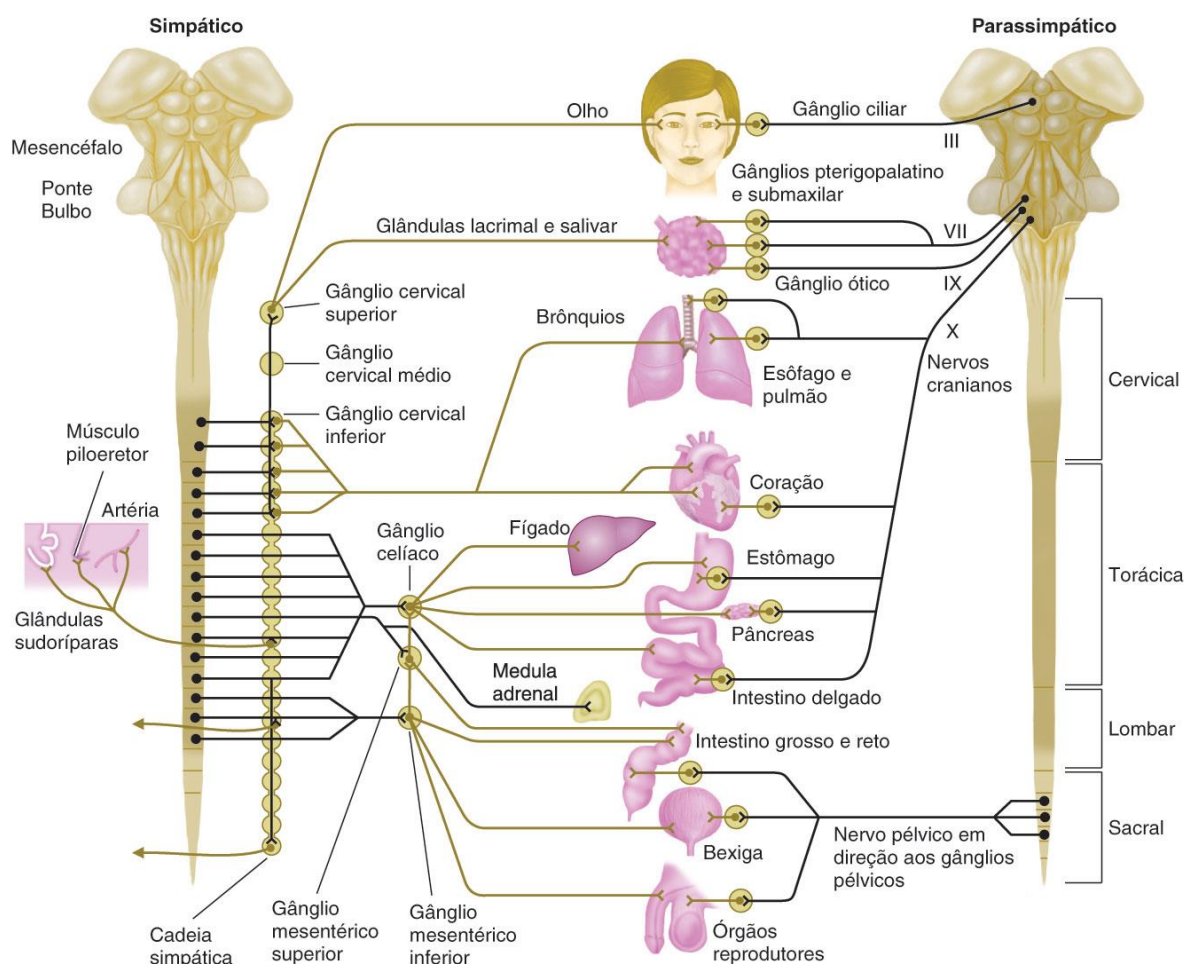


Fonte: DE MELLO AIRES, 2018

As glândulas salivares são inervadas por nervos simpáticos e parassimpáticos (Figura 3), que fazem parte do sistema nervoso autônomo, diferente das outras glândulas associadas ao trato gastrointestinal que podem apresentar também regulação hormonal (AMANO *et al.*, 2012). Alguns hormônios podem afetar a composição da saliva ao promover a reabsorção e/ou secreção de eletrólitos, como a vasopressina e a aldosterona, entretanto, eles não regulam o fluxo salivar (DE MELLO AIRES, 2018). A taxa de secreção salivar aumenta quando as glândulas são expostas, de forma simultânea, tanto a estímulos simpáticos, quanto parassimpáticos, sendo predominante a estimulação parassimpática. A inervação via receptores colinérgicos acinares (parassimpático) é responsável principalmente pela secreção

de água e eletrólitos, enquanto a inervação simpática pela secreção de proteínas (ORIÁ; BRITO, 2016).

Figura 3 - Inervação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático



Fonte: DE MELLO AIRES, 2018

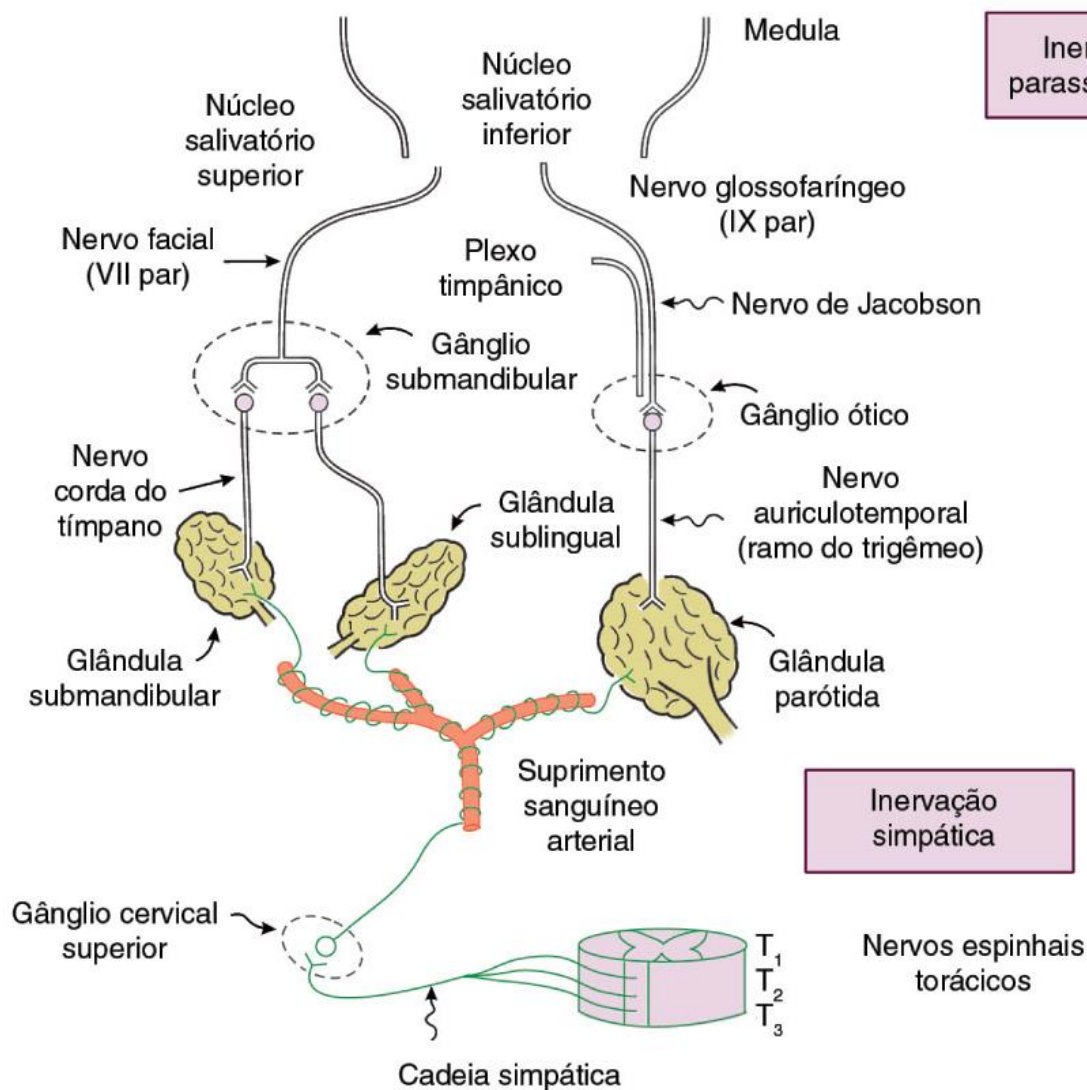
As fibras parassimpáticas pré-ganglionares eferentes que inervam as glândulas submandibular e sublingual partem da região do núcleo salivatório superior e se acoplam ao nervo facial (VII) (Figura 4). Ressalta-se que as glândulas lacrimais, glândulas mucosas do palato, das cavidades nasais e da língua também recebem fibras vindas do nervo VII. Do nervo facial, parte o nervo corda do tímpano cujas fibras se juntam ao nervo lingual, que é ramo do nervo mandibular (V). Nas proximidades das glândulas salivares, essas fibras realizam sinapse no plexo submandibular, local onde partem as fibras pós-sinápticas tanto para a glândula submandibular, quanto para sublingual (MELMED *et al.*, 2016; DE MELLO AIRES, 2018).

Já para a glândula parótida, as fibras parassimpáticas eferentes pré-ganglionares partem do núcleo salivatório inferior e se incorporam ao nervo glossofaríngeo (IX). Esse nervo também envia fibras para a língua e para pequenas glândulas salivares do assoalho da boca. O nervo IX atravessa o plexo timpânico seguindo pelo nervo petroso menor, fazendo sinapse no gânglio ótico, de onde as fibras pós-sinápticas partem até a glândula parótida, acoplando-se ao nervo aurículo-temporal (V) (DE MELLO AIRES, 2018).

A inervação simpática é similar entre as 3 principais glândulas. As fibras eferentes pré-ganglionares partem das regiões T1, T2 e T3 da medula espinhal realizando sinapses nos gânglios cervicais superiores, de onde partem as fibras pós-sinápticas para as glândulas salivares (MELMED *et al.*, 2016).

Ressalta-se que o controle fisiológico primário das glândulas salivares ocorre a partir do sistema nervoso autônomo parassimpático, mesmo que a excitação dos nervos simpáticos em conjunto com o parassimpático para as glândulas salivares estimule a secreção desse fluido. Caso não haja estimulação parassimpática, a salivação é completamente afetada e as glândulas salivares podem atrofiar. Tanto as células acinares, quanto as células dos ductos são innervadas por terminações nervosas parassimpáticas. Quando há a estimulação parassimpática, aumenta-se a síntese e secreção de amilase salivar e de mucina, há melhora na atividade de transporte nos ductos, aumento do fluxo sanguíneo para as glândulas e estimulação ao metabolismo das glândulas salivares (MELMED *et al.*, 2016; DE MELLO AIRES, 2018).

Figura 4 - Inervação simpática e parassimpática nas glândulas salivares



Fonte: DE MELLO AIRES, 2018

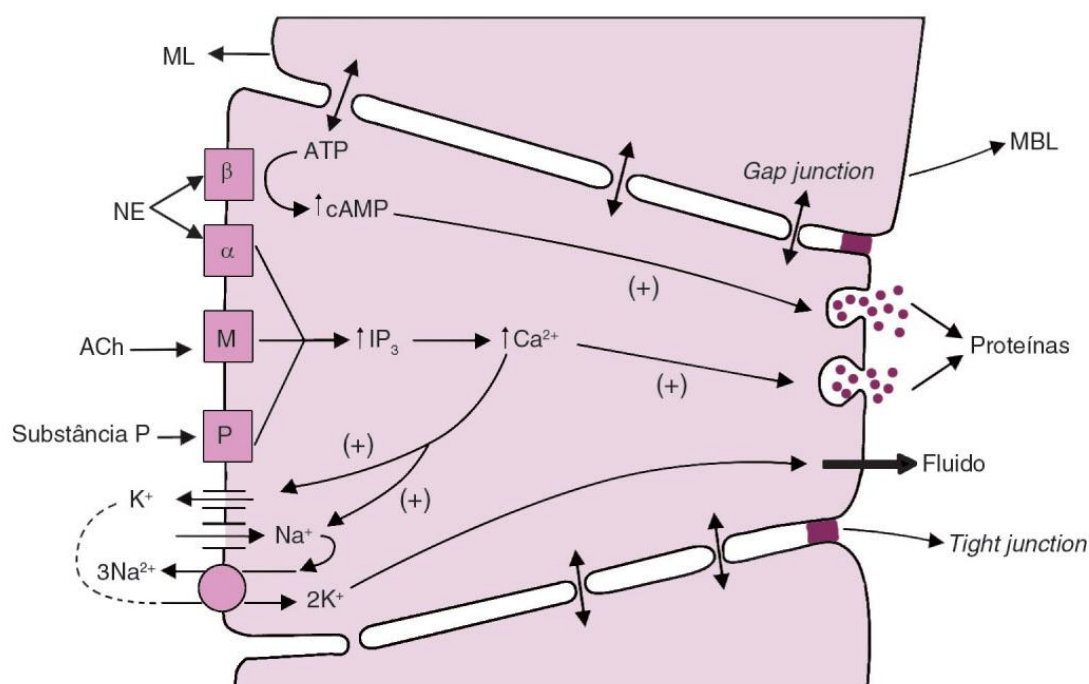
As fibras pós-ganglionares parassimpáticas são, predominantemente, colinérgicas e, por isso, requerem a participação da acetilcolina. Esse neurotransmissor se liga à receptores muscarínicos localizados na membrana basolateral das células acinares, elevando o nível de cálcio (Ca^{2+}) via inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) no citoplasma. Assim, há ativação de proteínas quinases C (PKC) que, ao promover a fosforilação de proteínas específicas, induz o aumento do fluxo salivar, bem como da secreção proteica dos ácinos (Figura 5) (DE MELLO AIRES, 2018).

A estimulação parassimpática promove o aumento do fluxo sanguíneo nas glândulas salivares, e conseqüentemente, o aumento da atividade metabólica das mesmas. Essa elevação do fluxo sanguíneo é estimulada por fibras parassimpáticas peptidérgicas, capazes de produzir e liberar peptídeos vasodilatadores, dentre eles a substância P e o VIP (Peptídeo vasoativo intestinal). Junto a isso, as células acinares possuem receptores para a substância P, elevando a concentração de Ca^{2+} citosólico e, por consequência, ativando canais de íons sódio e potássio (Na^+ e K^+) da membrana basolateral. Assim, há o aumento na atividade da bomba de sódio-potássio (Na^+/K^+) estimulando a secreção fluida (MELMED *et al.*, 2016).

Já as fibras pós-ganglionares simpáticas são adrenérgicas com a liberação de noradrenalina. Esse neurotransmissor pode se ligar aos receptores do tipo β_1 , onde o segundo mensageiro é o AMP_C (Monofosfato cíclico de adenosina) que irá estimular a secreção enzimática no fluido salivar, e ao receptor α_1 que promove o aumento de Ca^{2+} citosólico via IP_3 potencializando os efeitos da acetilcolina. Diferente da inervação parassimpática, caso a via simpática seja interrompida não haverá muitos efeitos tróficos sobre as glândulas salivares (DE MELLO AIRES, 2018).

A estimulação simpática, inicialmente, aumenta o fluxo secretor pois estimula a contração das células mioepiteliais via receptor adrenérgico, além de potencializar os efeitos da acetilcolina ao induzir a elevação de Ca^{2+} citosólico. Entretanto, em um segundo momento, há a diminuição da secreção salivar devido a vasoconstrição. Por isso, a saliva estimulada pelos agonistas adrenérgicos apresenta pequeno volume, alta viscosidade devido a riqueza de muco e alta concentração de K^+ e HCO_3^- (ânion bicarbonato). Por conta disso, nas situações de “luta ou fuga” observa-se o efeito de boca seca (MELMED *et al.*, 2016; DE MELLO AIRES, 2018).

Figura 5 - Efeitos do SNA simpático e parassimpático sobre a secreção da célula acinar



Legenda: SNA = Sistema nervoso autônomo; NA = noradrenalina; ACh = acetilcolina; IP_3 = trifosfato de inositol; AMPc = monofosfato cíclico de adenosina; ML = membrana luminal; MBL = membrana basolateral; GP = gap junctions; TJ = tight junctions; α e β = receptores noradrenérgicos α e β , respectivamente; M = receptor muscarínico; P = receptor peptidérgico.

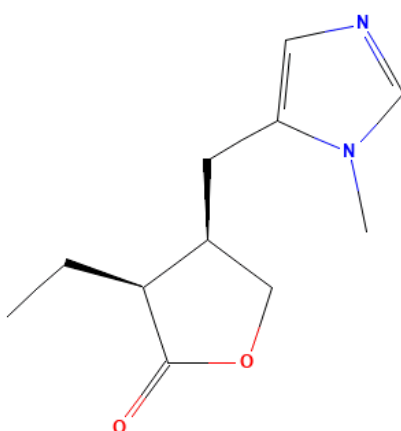
Fonte: DE MELLO AIRES, 2018

Existem mecanismos que podem levar tanto ao estímulo quanto à inibição da salivação. Ela pode ser inibida pela fadiga, sono, medo, desidratação e estimulada por reflexos condicionados ativados por diferentes receptores como visuais, auditivos e olfativos. Ainda, a estimulação das papilas gustativas com determinados sabores pode induzir o aumento da salivação, como por exemplo, azedos e cítricos. Um dos principais fatores que atua sobre o fluxo salivar é a chegada do alimento à cavidade oral, havendo a ativação de mecano e quimiorreceptores tanto da mucosa oral quanto da faringe, caracterizando a fase cefálica da secreção salivar (DE MELLO AIRES, 2018; FEMIANO *et al.*, 2011).

A administração de substâncias que ativam ou inibem o sistema parassimpático influencia, diretamente, aumentando ou diminuindo a secreção de saliva. A pilocarpina (Figura 6) é um alcaloide natural extraído de plantas do gênero *Pilocarpus* com atividade agonista colinérgica ligando-se, de forma predominante, a receptores muscarínicos e aumentando a secreção de glândulas exócrinas, dentre elas as glândulas salivares. Portanto, a

pilocarpina age como um parassimpaticomimético. Essa substância é utilizada como tratamento para xerostomia, que é uma condição que provoca a produção insuficiente de saliva, e síndrome de Sjögren, uma doença autoimune crônica que afeta as glândulas produtoras lacrimais e salivar. Entretanto, é importante ressaltar que a substância, ao estimular o sistema nervoso autônomo parassimpático, irá ocasionar outros efeitos além do aumento da salivação (BERNARDI *et al.*, 2002; FEMIANO *et al.*, 2011).

Figura 6 - Estrutura molecular da pilocarpina



Fonte: Pilocarpine – PubChem

A maioria dos compostos orgânicos presentes na saliva são originados no próprio local pela síntese das glândulas salivares. Entretanto, algumas moléculas são capazes de chegar à saliva a partir do sangue. Esse processo pode acontecer de forma intracelular, por transporte passivo ou ativo, ou extracelular via ultrafiltração (Figura 7) (BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016).

O transporte passivo é a forma mais comum de substâncias chegarem na saliva a partir do sangue. Os capilares que se encontram ao redor das glândulas salivares são permeáveis para moléculas pequenas. Nesse processo, não há gasto energético e não são necessários transportadores específicos. A capacidade de difusão da molécula vai depender do seu tamanho e da sua polaridade. Moléculas menores e apolares têm maior facilidade em atravessar a camada fosfolipídica das células dos ductos, por exemplo, hormônios esteroides por serem lipofílicos atravessam facilmente por transporte passivo, enquanto moléculas

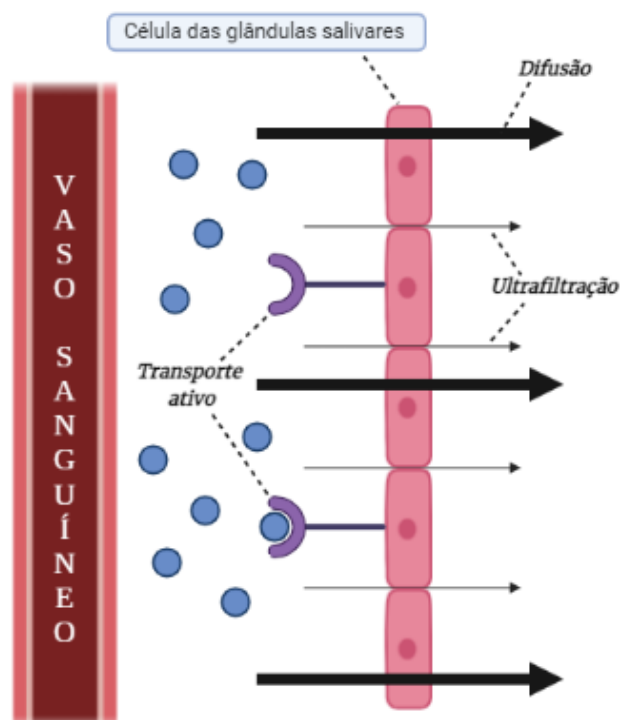
ligadas à extensas cadeias de proteínas, como albumina sérica, não conseguem atravessar por esse mecanismo (PFAFFE *et al.*, 2011; BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016).

O transporte ativo é utilizado pelas células para movimentar as moléculas através da membrana contra os gradientes eletroquímicos e, por isso, requer gasto de energia. Esse mecanismo é observado na entrada da IgA secretora na saliva. A IgA polimérica, secretada pelas células do linfócito B, quando se encontra próxima às células das glândulas salivares, liga-se aos receptores de IgA presentes nas células do ácino. Assim, a IgA é internalizada, transportada por transcitose e liberada no fluido oral (PFAFFE *et al.*, 2011; BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016; ANDREAZZI *et al.*, 2020).

A ultrafiltração é o transporte observado entre os espaços das células dos ácinos e dos ductos. As moléculas precisam ser, relativamente, pequenas e que tenham a capacidade de atravessar a bicamada fosfolipídica das membranas celulares devido suas cargas elétricas. Esse processo pode acontecer também através das junções comunicantes entre as células das unidades secretoras. Além disso, apenas moléculas com até 1900 daltons, como água, íons, catecolaminas e esteróides conseguem ser transferidos à saliva por esse processo. Normalmente, suas concentrações no fluido oral são de 300 a 3000 vezes inferiores à observado no plasma (PFAFFE *et al.*, 2011; BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016).

Por fim, há ainda o processo de transudação onde os componentes do soro que estão localizados nos capilares no interior da cavidade oral, na mucosa, entre os dentes e gengivas, chegam à saliva. A presença de algumas moléculas plasmáticas típicas na saliva, como albumina plasmática, depende, principalmente, desse mecanismo (PFAFFE *et al.*, 2011; BARBOSA JÚNIOR; BAPTISTA; BARBOSA, 2016; ANDREAZZI *et al.*, 2020).

Figura 7 - Mecanismos de transporte de substâncias do sangue para saliva



Fonte: A autora, 2023 – Criado em Biorender.com

Aplicação da saliva como fluido diagnóstico

A utilização da saliva para auxiliar no diagnóstico de alterações bucais, como o risco de cárie, marcadores de doenças periodontal e disfunções nas glândulas salivares já é uma realidade (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). Além disso, a saliva pode ser usada na detecção de candidíase oral, uma vez que a contagem dos fungos salivares pode refletir a colonização desses microorganismos na mucosa. Em pacientes em tratamento quimioterápico, foram observados níveis aumentados de albumina no fluido salivar e, por consequência, desenvolveram estomatite. Realizar o monitoramento de albumina salivar em pacientes pode tanto auxiliar no ajuste de dosagem dos quimioterápicos, quanto iniciar tratamento precoce para estomatite (DEEPA; THIRRUNAVUKKARASU, 2010).

Diversas pesquisas que envolvem tanto os componentes quanto as funções salivares são desenvolvidas para fornecer embasamento para a utilização da saliva como marcador de diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças locais e sistêmicas. Principalmente porque além desse fluido fornecer informações importantes sobre o organismo, sua coleta não é invasiva e ocorre de forma fácil. Refletindo o estado de saúde do corpo, as amostras salivares

podem ser analisadas quanto os níveis de fluidos teciduais de substâncias introduzidas de forma natural, terapêutica e recreativa; estado emocional; estado hormonal; estado imunológico; estado neurológico; influências nutricionais e metabólicas (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A saliva pode ser utilizada para o monitoramento no uso de drogas. Para que a substância apareça no fluido oral, deve ser transportado a partir do plasma. E isso pode acontecer com moléculas de drogas pequenas e que apresentam caráter lipofílico, já que se difundem de forma fácil pela membrana plasmática. A cotinina, um metabólito da nicotina, é amplamente utilizada para avaliar o uso de tabaco e em estudos sobre os efeitos do tabagismo na saúde. Atualmente, a avaliação da saliva permite detectar níveis de algumas substâncias como lítio, carbamazepina, barbitúricos, benzodiazepínicos, cafeína, além de drogas de abuso como anfetaminas, cocaína, etanol, maconha, opioides (GREABU *et al.*, 2009; DEEPA; THIRRUNAVUKKARASU, 2010).

Em relação ao monitoramento de níveis hormonais salivares, sua importância clínica seria relevante caso eles refletissem os níveis séricos ou caso exista uma correlação constante entre os níveis hormonais plasmáticos e os salivares (GREABU *et al.*, 2009). A maioria dos hormônios chegam à saliva via transporte passivo, enquanto algumas moléculas polares pequenas por ultrafiltração. Os hormônios lipossolúveis de baixo peso molecular tendem a ser detectados de forma mais precisa e confiável na saliva do que aqueles hormônios que são ligados às proteínas (GREABU *et al.*, 2009; DEEPA; THIRRUNAVUKKARASU, 2010). Por isso, os hormônios esteroides na saliva estão na sua forma livre, ou seja, na forma ativa. Enquanto no sangue, a maioria das avaliações refletem o nível total do hormônio. Cortisol, aldosterona, estradiol, progesterona e testosterona são alguns hormônios que podem ser avaliados com boa precisão nesse fluido (GREABU *et al.*, 2009; ANDREAZZI *et al.*, 2020).

A saliva é também amplamente utilizada em estudos forenses. As amostras podem ser obtidas a partir de copos, bitucas de cigarro, envelopes e, em seguida, usadas para detectar substâncias do grupo sanguíneo ou proteínas genéticas presentes na saliva, principalmente polimorfismos de proteína. Cerca de 90% da população secreta antígenos dos grupos sanguíneos na saliva e, por isso, tem sido usado na identificação de indivíduos em casos criminais e de paternidade (MALAMUD, 2011).

O fluido salivar apresenta importante sensibilidade e especificidade em testes detectores para infecção virais por HIV, vírus da herpes, citomegalovírus, Epstein-Barr e Hepatite C. A base para a maioria dos testes diagnósticos em virologia é a resposta de anticorpos à infecção e, como se sabe, a saliva apresenta em sua composição

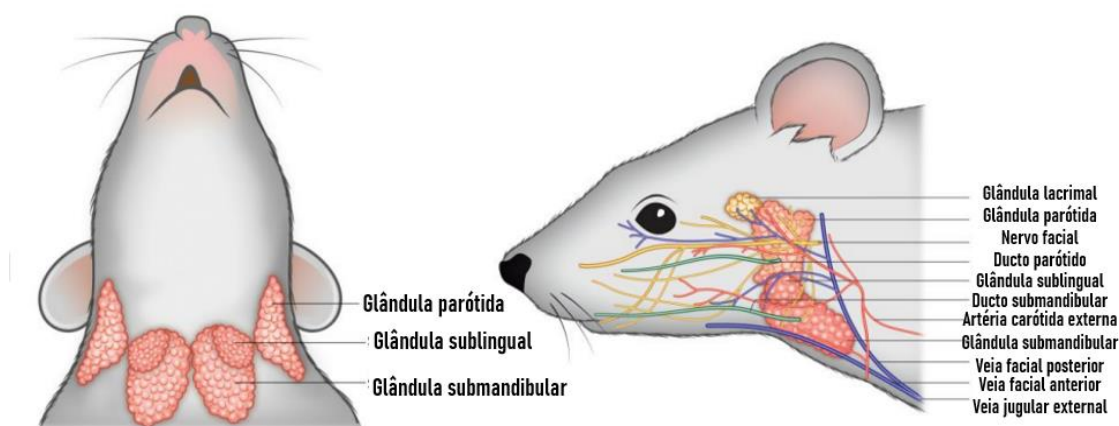
imunoglobulinas, sobretudo, imunoglobulina A (IgA). Por isso, os anticorpos contra os vírus e os seus componentes podem ser detectados nesse fluido, auxiliando no diagnóstico da infecção aguda, congênita ou sua reativação (GREABU *et al.*, 2009).

A presença de inúmeros compostos de amplo espectro na saliva possibilita que ela apresente vantagens na sua aplicação em diagnósticos clínicos. Sua coleta é um processo não invasivo e indolor, de fácil armazenamento e transporte, possibilitando coletas tranquilas em indivíduos de todas as idades, além de gestantes e lactantes (PFAFFE *et al.*, 2011).

Anatomia das glândulas salivares em modelo animal

Os ratos apresentam 3 grupos principais de glândulas salivares: Parótida, submandibular e sublingual, semelhante aos humanos, além de apresentarem algumas glândulas salivares menores. Em roedores, a glândula parótida está localizada atrás e abaixo da orelha, contornando caudalmente a glândula submandibular (Figura 8). As glândulas sublinguais localizam-se juntamente com as glândulas submandibulares, nos espaços anteriores do pescoço entre os gânglios linfáticos submandibulares e o esterno (Figura 8) (CHEYNE, 1939; AMANO *et al.*, 2012).

Figura 8 - Localização das glândulas salivares em roedores



Fonte: Adaptado de MARUYAMA *et al.*, 2019

De modo similar ao que ocorre em humanos, as glândulas parótidas são formadas por ácinos serosos, que secretam solução proteica abundante em prolina, IgA secretora,

imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina M (IgM) e amilase. A glândula submandibular também possui a mesma formação que a glândula parótida, células acinares serosas. Entretanto, diferencia-se da glândula submandibular humana, que é composta tanto por células acinares serosas quanto mucosas. Já as glândulas sublinguais são mistas, apresentando tanto ácinos serosos quanto mucosos, similar ao observado em humanos (CHEYNE, 1939; AMANO *et al.*, 2012; MARUYAMA *et al.*, 2019).

O sistema de ductos dos roedores é formado pelos ductos intercalados, estriados e excretores, de forma similar com o sistema referente aos humanos. A saliva é produzida pelas células secretoras acinares e flui através dos ductos intercalares, ductos estriados e, por fim, nos ductos excretores (AMANO *et al.*, 2012).

Os ductos estriados possuem a função de secretar e reabsorver os eletrólitos que são transportados de forma bidirecional entre o lúmen do ducto e os espaços extracelulares. Esse transporte que ocorre transmembrana é realizado, sobretudo, por canais iônicos. O ducto intercalado localiza-se entre o ducto estriado e o ácino, recebendo a saliva primária desse último (AMANO *et al.*, 2012; MARUYAMA *et al.*, 2019).

Nos roedores observa-se, ainda, o ducto granular que está localizado entre o ducto intercalar e o ducto estriado na glândula submandibular. O principal tipo celular presente nesse ducto é a célula colunar alta que, em seu citoplasma, contem inúmeros grânulos secretores. Esses grânulos apresentam fatores de crescimento celular e hormônios que são exocitados em resposta tanto à estímulos neurais quanto hormonais (CHEYNE, 1939; AMANO *et al.*, 2012).

Observa-se que as glândulas salivares de roedores apresentam, histologia semelhante às humanas, mas com distinções, especialmente nas glândulas submandibulares. Isso porque esse grupo de glândulas nos roedores desenvolvem túbulo contorcido granular que produz uma série de fatores de crescimento celular que não ocorre nos humanos (AMANO *et al.*, 2012).

Coleta de saliva em ratos

Suckow, Weisbroth e Franklin (2006) indicam que, geralmente, a coleta de saliva em ratos pode acontecer de 4 formas: coleta direta de extremidade seccionada de um ducto salivar isolado de forma cirúrgica; canulação de um ducto salivar; remoção de glândula salivar por necropsia e coleta direta da cavidade oral.

Cheyne (1939) iniciou os estudos acerca da extirpação de glândulas salivares devido a necessidade de estudos que avaliassem essas glândulas além das suas funções já conhecidas como o auxílio na deglutição e digestão dos alimentos. Para isso, utilizou ratos albinos (*Mus norvegicus albino*) para desenvolver técnicas de remoção cirúrgica dessas glândulas. Nesse procedimento, anestesia-se o animal com nembutal (barbitúrico) em dose que o mesmo permaneça desacordado por, aproximadamente, 3 horas. Em seguida, realiza-se o procedimento em 3 etapas: 1) remove-se a glândula parótida, sublingual e submandibular de um lado; 2) apenas com a recuperação completa do animal, repete-se do outro lado; 3) por fim, cauteriza-se as glândulas sublinguais menores dos dois lados. Esse método é sugerido para estudar as funções das glândulas salivares tanto em relação às suas atividades metabólicas quanto à infecções bucais.

Em relação à remoção de glândula salivar na necropsia, Suckow, Weisbroth e Franklin (2006) informam que uma glândula salivar inteira pode ser removida nesse procedimento e coletada para pesagem e/ou análise de proteína secretora.

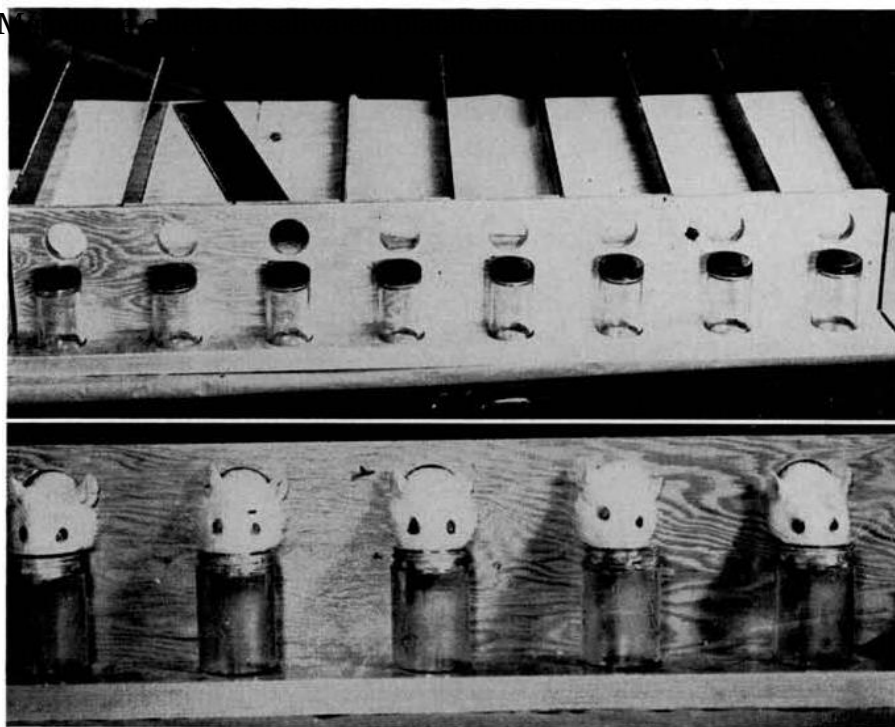
A coleta de saliva com a canulação de um ducto salivar pode ocorrer a partir de qualquer um dos três tipos de glândula salivar. Hellekant e Kasahara (1973) utilizaram tubos de polietileno para inserir no orifício do ducto e realizar a coleta em animais previamente anestesiados. Volumes de até 0,8 mililitros (mL) poderiam ser coletados a partir de ductos submaxilares e 0,2 mL de ductos parotídeos em ratos de 200 gramas. Vissink e colaboradores (1989) descreveram a coleta de saliva a partir dos ductos salivares parotídeos e submandibulares usando um mini copo conectado por um tubo de silicone a uma bomba de vácuo. O copo foi colocado sobre o orifício do ducto em um rato anestesiado e a saliva foi coletada em um recipiente.

Em relação à coleta direta da cavidade oral, após o animal ser anestesiado e ter sido ou não administrado substância indutora de salivação, o fluido pode ser coletado em tubo graduado diretamente da boca do animal conforme pinga. Ou, ainda, pode-se colocar discos de algodão ou de papel filtro diretamente na cavidade oral.

Bernarde e colaboradores (1956), visando obter quantidades de saliva adequadas para investigar cepas susceptíveis e resistentes à cárie em ratos albinos, estudaram mecanismos para a indução da salivação e sua posterior coleta direta na cavidade oral. Os animais eram mantidos em plataforma inclinada a 8° com a boca no interior de um recipiente (Figura 9). Posteriormente, foram anestesiados com nembutal (barbitúrico) na dose de 20 mg/kg de peso corporal via intraperitoneal. Caso a anestesia não fosse bem sucedida, aumentava-se a dose com 5 mg/kg, alcançando no máximo 50 mg/kg de peso corporal. Em seguida, administrava-se

nitrito de pilocarpina na dose de 5 mg/kg de peso corporal via subcutânea. A dose administrada da substância produziu nível de salivação similar à obtida com a dose de 100 mg/kg de peso corporal. Após administração das duas substâncias, o animal era mantido na plataforma inclinada por, aproximadamente, 20 minutos proporcionando de 2 a 5 mL do fluido para um animal adulto.

Figura 9 - N



Fonte: BENARDE *et al.*, 1956

Na literatura, existem outros protocolos de coleta de saliva direta da cavidade oral que modificam algumas etapas do protocolo desenvolvido por Bernarde e colaboradores (1956). Em Costa (2009), a modificação observada é em relação à anestesia, visto que é administrado xilazina (25 mg/kg de peso corporal) e ketamina (45 mg/kg de peso corporal) via intramuscular. Já a administração de pilocarpina ocorreu via intraperitoneal. Além disso, os animais apresentavam 30 dias e 90 dias de idade e foram mantidos em jejum de 12 horas pré-coleta.

Romero e colaboradores (2016) também realizaram a coleta direta de saliva da cavidade oral, anestesiando os animais com a combinação de xilazina (0,1 mL/kg de peso corporal) e ketamina (1 mL/kg de peso corporal), e a dose de pilocarpina administrada foi de 0,6 mg/kg de peso corporal em animais de peso aproximado de 200 gramas. Além disso, a coleta foi realizada utilizando pequenas bolas de algodão pré-pesadas inseridas na boca do

animal por 40 minutos. Ainda, Romero, Ibuki e Nogueira (2012) com mesma amostra de animais, induziram a salivação com pilocarpina na dose de 1,0 mg/kg de peso corporal ou com isoproterenol (Agonista β adrenérgico – simpaticomimético) na dose de 5,0 mg/kg de peso corporal. Ambas substâncias foram dissolvidas em água destilada e a coleta foi realizada com o gotejamento da saliva produzida em tubos plásticos.

Matsuzaki e colaboradores (2018) trabalharam com um grupo de ratos com 110 dias de idade. Para a induzir a salivação, os animais foram anestesiados, entretanto, não foi informado a substância e dose, posteriormente, administrou-se a pilocarpina intraperitoneal, na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal. Colocou-se uma bola de algodão previamente pesada na boca do animal e, a cada 10 minutos, o algodão era trocado. Esse processo foi mantido por 1 hora e o algodão foi centrifugado para que a saliva fosse coletada.

Torregrossa e colaboradores (2014) também realizaram a coleta de saliva de forma direta na cavidade oral dos ratos, entretanto, eles encontravam-se acordados e a indução da salivação foi feita com administração de solução com a mistura de sabores azedo e doce. Inicialmente, treinou-se os animais com a administração de 2 mL de ácido cítrico 30 mM em sacarose 1 molar (M). Essa solução era pipetada diariamente na boca do animal, com incrementos de 200 microlitros (μ L). O animal foi mantido com a palma da mão contra o peito do experimentador enquanto a cabeça e a boca eram estabilizadas pelos dois primeiros dedos e pelo polegar. O treinamento ocorreu por 12 dias seguidos com duração, aproximada, de 20 minutos. Após o treinamento, o procedimento de coleta de saliva ocorreu pipetando a solução agridoce na boca do animal e mantendo-o em descanso por 60 segundos, para minimizar a contaminação do fluido. A saliva foi aspirada abaixo e ao redor da língua com uso de uma pipeta.

Martin e colaboradores (2018) seguiram o mesmo protocolo de Torregrossa e colaboradores (2014) e observaram que o treinamento prévio condicionava a salivação dos animais apenas com a inserção da pipeta na boca, sem precisar administrar a solução agridoce.

ESTRESSE OXIDATIVO

A síntese de espécies reativas ocorre tanto por processos fisiológicos do organismo, quanto em resposta à estímulos externos nocivos. O sistema de defesa antioxidante atua com intuito de manter essas espécies em limites fisiológicos suportáveis pelo organismo. O

estresse oxidativo é instaurado quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas e a atuação dos antioxidantes, em benefício dos primeiros, acarretando interrupção da sinalização redox e controle ou dano molecular. (BARBOSA *et al.*, 2010; SIES; BERNDT; JONES, 2017).

Espécies reativas

Espécies reativas (ER) consistem em moléculas altamente instáveis e reativas formadas através de reações de óxido-redução. Sua instabilidade é fornecida pela presença de número ímpar de elétrons na sua última camada eletrônica e, por isso, reage com diversas moléculas do organismo a fim de alcançar sua estabilidade eletrônica (BARBOSA *et al.*, 2010; MENDES; BEHLING; FRIZZO, 2011; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020; ENGERS). Espécies reativas de oxigênio (ERO) é um termo coletivo que inclui agentes oxidantes originados de oxigênio, enquanto espécies reativas de nitrogênio (ERN) inclui aqueles originados de nitrogênio (Quadro 2) (HALLIWELL, 2006; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Quadro 2 - Principais espécies reativas e sua atividade

Espécie reativa	Atividade
Radical Superóxido (O_2^-)	Formado após a primeira redução de O_2; Ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos; Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de O_2.
Radical Hidroperoxila ($HO_2\cdot$)	Representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio; Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas.
Radical Hidroxila ($OH\cdot$)	Considerado a ERO mais reativa em sistemas biológicos; A combinação extremamente rápida do $OH\cdot$ com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade - Se o hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este DNA estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA; Pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas ($-SH$) a pontes dissulfeto ($-SS$); Pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).
Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)	Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o $OH\cdot$; O H_2O_2 tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++}. Altamente tóxico para as células.
Oxigênio singlet (1O_2)	É forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada; O 1O_2 tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença.

Fonte: Adaptado de FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARBOSA et al., 2010

A síntese de ER ocorre tanto a partir de reações não enzimáticas quanto enzimáticas. As reações não enzimáticas ocorrem quando o oxigênio reage com compostos orgânicos ou quando as células são expostas às radiações ionizantes. Já as reações enzimáticas estão envolvidas na cadeia respiratória, síntese de prostaglandinas, fagocitose, no sistema que envolve citocromo P450, além da atividade das enzimas NADPH (fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida) oxidase, xantina oxidase e peroxidases (HALLIWELL, 2006; CAMPOS; LEME, 2018).

Além disso, as espécies reativas podem ser sintetizadas a partir de fontes endógenas, ou seja, pela ativação de células do sistema imune, processo inflamatório, processos infecciosos, prática de exercício físico excessivo, isquemia, envelhecimento, e também através de fontes exógenas. Essas podem ser a exposição à poluentes ambientais, metais pesados, alguns medicamentos, solvente químico, consumo de alimentos ultraprocessados, fumaça de cigarro, álcool e radiações. Essas substâncias, ao penetrarem no organismo, podem ser degradadas ou metabolizadas gerando, assim, as espécies reativas como subprodutos (MORAES; SAMPAIO, 2010; SILVA; JASIULIONIS, 2014; PIZZINO *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que as espécies reativas, quando em concentrações baixas ou moderadas, são importantes para o bom funcionamento do organismo, uma vez que processos fisiológicos requerem a participação dessas moléculas (PIZZINO *et al.*, 2017). Esse processo de estresse oxidativo fisiológico é denominado como eutresse (SIES; BERNDT; JONES, 2017). As espécies reativas são necessárias para a atividade de algumas células do sistema imune conter o patógeno como, por exemplo, os fagócitos. Eles sintetizam e armazenam as espécies reativas e as liberam a fim de conter microorganismos invasores que precisam ser destruídos. Além de serem necessários na síntese de algumas estruturas celulares, estão envolvidos na regulação de cascatas de sinalização intracelular em alguns tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais, células musculares lisas vasculares, miócitos cardíacos (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; PIZZINO *et al.*, 2017). Há ainda uma importante atuação do óxido nítrico, um dos principais ERN, envolvido na modulação adequada do fluxo sanguíneo, na defesa inespecífica do hospedeiro e também crucial para a atividade neural normal (PIZZINO *et al.*, 2017; CAMPOS; LEME, 2018).

Antioxidantes

Os antioxidantes consistem em substâncias que, em menores concentrações que o substrato oxidável, tem a função de dificultar ou inibir a ação das espécies reativas sobre a oxidação de tais substratos. Existem alguns mecanismos de atuação do sistema de defesa antioxidante para alcançar sua função de forma eficiente: prevenção, ao impedir a síntese das espécies reativas; varredura, impedindo a ação delas; reparo, favorecendo o reparo e reconstituição das estruturas biológicas que sofreram algum dano. Podem agir de forma direta ao neutralizar a ação das espécies reativas ou indireta, atuando junto aos sistemas enzimáticos. (BARBOSA *et al.*, 2010)

Os antioxidantes podem ser endógenos, caracterizados por serem inatos do próprio organismo, e exógenos, os quais devem ser absorvidos via alimentação ou suplementação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Ainda, podem ser classificados como enzimáticos ou não-enzimáticos (Quadro 3). O sistema de defesa enzimático, que inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), age a partir de mecanismos de prevenção, ao impedir a formação das espécies reativas que se envolvem com o início das reações em cadeia que geram tanto a propagação quanto amplificação do processo que, por consequência, gera os danos oxidativos. Ressalta-se que, muitas vezes, a ação dessas enzimas requer a participação de cofatores enzimáticos, normalmente, provenientes da dieta. O sistema não-enzimático inclui, sobretudo, os compostos antioxidantes proporcionados pela dieta, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA *et al.*, 2010; CATALÁN; FRÜHBECK; GÓMEZ-AMBROSI, 2018).

Quadro 3 - Principais antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos

Antioxidante	
Endógeno não-enzimático	Bilirrubina Tióis (Glutationa, Ácido lipóico, N-acetilcisteína) NADPH e NADH Ubiquinona (Coenzima Q10) Ácido úrico
Endógeno enzimático	Superóxido dismutase - dependente de Cobre, Zinco e, Magnésio Catalase - dependente de Ferro Glutationa peroxidase - dependente de Selênio
Exógenos	Vitamina C Vitamina E Carotenóides e oxicarotenóides Polifenóis

Fonte: Adaptado de KRISHNAMURTHY; WADHWANI, 2012; MENDES; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020

As enzimas CAT, SOD e GPx e alguns tióis atuam na remoção catalítica de espécies reativas, enquanto glutatona reduzida (GSH), vitamina E, vitamina C, bilirrubina e ácido úrico reduzem as espécies reativas ao promoverem a doação de elétrons. Há ainda proteínas que possuem a capacidade de se ligar a íons metálicos pró-oxidantes que estão relacionados com a geração de espécies reativas, dentre elas a albumina, ceruloplasmina e metalotioeína (se ligam ao cobre e ferritina), mioglobina e transferrina (se ligam ao ferro) (KRISHNAMURTHY; WADHWANI, 2012).

Consequências do estresse oxidativo

O estresse oxidativo é instalado quando há um desequilíbrio entre a formação e a destruição das espécies reativas, seja pelo aumento da síntese ou redução da atividade antioxidante do meio que desacelera o processo de remoção dos mesmos (MORAES; SAMPAIO, 2010). A instalação desse ambiente acarreta a oxidação das biomoléculas como proteínas, lipídios, lipoproteínas, DNA e membrana plasmática e, por consequência, a possível perda das suas respectivas funções biológicas. Esse processo excessivo e tóxico é denominado como distresse (SIES; BERNDT; JONES, 2017). Caso se torne um processo crônico, o estresse oxidativo pode influenciar no processo etiológico de algumas doenças crônicas não transmissíveis, além de acelerar o processo de envelhecimento e causar disfunções agudas (BARBOSA *et al.*, 2010).

O câncer é uma doença complexa que requer tanto alterações celulares quanto moleculares que podem ser engatilhadas por diversos fatores, endógenos ou exógenos. O dano oxidativo ao DNA é um dos estímulos conhecidos responsáveis pelo desenvolvimento do câncer. Em relação às doenças neurodegenerativas, o dano oxidativo desempenha papel fundamental na perda de neurônios e na progressão para a demência na doença de Alzheimer, além disso, a síntese de β -amilóide, peptídeo tóxico observado nessa doença, ocorre por ação das espécies reativas (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; PIZZINO *et al.*, 2017).

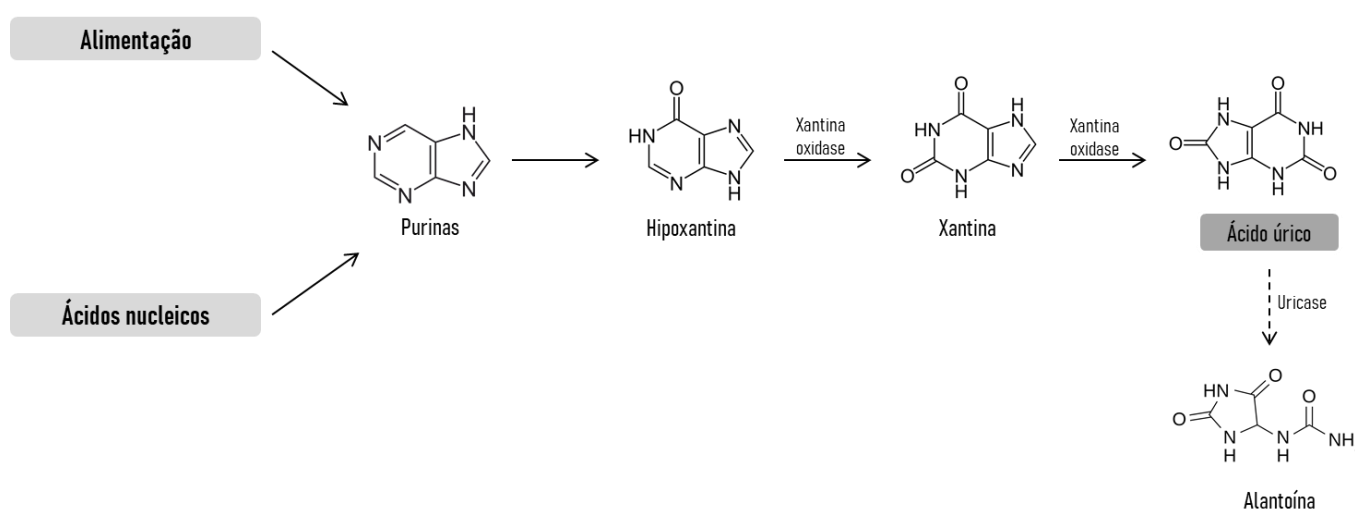
O estresse oxidativo também atua como um desencadeador da aterosclerose. A formação da placa de ateroma resulta de uma inflamação endotelial precoce que leva à geração de espécies reativas por macrófagos que são mobilizados para o local da lesão. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) circulantes são oxidadas pelas espécies reativas e há a formação de células espumosas e acúmulo de lipídios no local. No diabetes do tipo II, as espécies reativas podem induzir a inativação dos mecanismos de sinalização entre os receptores de insulina e o sistema de transporte de glicose, causando resistência à insulina (PIZZINO *et al.*, 2017; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

ÁCIDO ÚRICO

O ácido úrico é um composto orgânico sintetizado a partir das purinas, que são as bases nitrogenadas adenina e guanina. As purinas são originadas de forma exógena, pela alimentação, ou de forma endógena. Alimentos ricos em proteína são fontes de purina. Essa molécula será convertida a hipoxantina e essa, por ação da enzima xantina oxidase, convertida

à xantina. Novamente por ação da xantina oxidase, há a formação de ácido úrico (Figura 10). Com a evolução, os humanos perderam a atividade da enzima uricase/urato oxidase que é responsável pela metabolização de ácido úrico em alantoína, mas essa enzima é observada na maioria dos mamíferos, incluindo os roedores. Por esse motivo, os humanos apresentam níveis mais altos de ácido úrico, em torno de 6,0 mg/dL, enquanto na maioria dos mamíferos é de 0,5-1,0 mg/dL (DE OLIVEIRA; BURINI, 2012).

Figura 10 - Síntese do ácido úrico



Fonte: Adaptado de EL RIDI; TALLIMA, 2017

A síntese do ácido úrico acontece no fígado e sua excreção é mais notada nos rins (65-75%), enquanto o intestino auxilia esse processo em, aproximadamente, 30%. Nos rins, o ácido úrico é filtrado e, posteriormente, secretado. A maior parte costuma ser reabsorvida e retorna ao sangue (DE OLIVEIRA; BURINI, 2012; NERY *et al.*, 2015). Por ser um ácido fraco e possuir alta constante de ionização, o ácido úrico circula no plasma, predominantemente, na forma de urato (um sal de sódio monovalente). No plasma, apresenta-se ligado à albumina, que é seu principal transportador e também lhe confere maior solubilidade (DE OLIVEIRA; BURINI, 2012; FABBRINI *et al.*, 2014; MAIUOLO *et al.*, 2016).

O ácido úrico possui excelente atividade antioxidante, sendo responsável por 60% da capacidade plasmática e aproximadamente 90% da capacidade salivar em neutralizar as espécies reativas (FABBRINI *et al.*, 2014; NERY *et al.*, 2015). A sua atuação, além de frear as espécies reativas de oxigênio, previne a oxidação de LDL, que é um ponto importante no

desenvolvimento das placas de ateroma, e também evita a inativação da enzima SOD. Em concentrações fisiológicas, o ácido úrico apresenta importante papel protetor no organismo (SOUKUP *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2021).

Entretanto, em condições acima das fisiológicas pode desempenhar papel prejudicial ao organismo. A hiperuricemia é observada quando há um desequilíbrio entre a síntese do ácido úrico e os processos de secreção e reabsorção. Diversos estudos indicam que essa condição ocorre quando o nível de ácido úrico está acima de 7 mg/dL em homens e 6 mg/dL em mulheres (SUN *et al.*, 2021). Uma das principais consequências ocasionadas por essa condição é a gota: doença crônica causada pela deposição de cristais de urato monossódico nas articulações e a hiperuricemia é o principal fator de risco (DE OLIVEIRA; BURINI, 2012; EL RIDI; TALLIMA, 2017; SUN *et al.*, 2021).

O aumento dos níveis de ácido úrico pode estar relacionado a outras alterações no organismo, como a doença crônica renal. A hiperuricemia aumenta o risco de lesão renal aguda, prejudica a atividade contrátil das células mesangiais intraglomerulares, induzindo danos às células epiteliais nessa região e nos túbulos proximais. Além disso, o ácido úrico pode se acumular no rim, levando à formação e deposição de cálculos. (SAUTIN; JOHNSON, 2008; FABBRINI *et al.*, 2014).

Doenças cardiovasculares e síndrome metabólica também são condições que podem estar relacionadas com alterações nos níveis de ácido úrico sérico. Estudos experimentais sugerem que o ácido úrico tem a capacidade de penetrar nas fibras musculares lisas induzindo a ativação de inúmeras vias de transdução de sinal que acarretam na expressão de mediadores inflamatórios. Por consequência, há aumento da pressão arterial e hipertrofia das células musculares lisas. Também já é relatado que o risco de infarto agudo do miocárdio aumenta com o acúmulo de ácido úrico (DE OLIVEIRA; BURINI, 2012; SUN *et al.*, 2021).

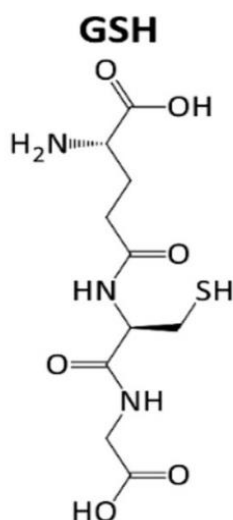
Assim, o ácido úrico apresenta um paradoxo no organismo, podendo ser relacionado tanto a funções benéficas, quanto a alterações metabólicas prejudiciais ao funcionamento do organismo (DE OLIVEIRA; BURINI, 2012; EL RIDI; TALLIMA, 2017; SUN *et al.*, 2021).

GLUTATIONA REDUZIDA

A GSH é um tripeptídeo que contém tiol em sua estrutura e é um importante antioxidante do organismo. É encontrado em altas concentrações, principalmente, no citosol das células dos organismos aeróbicos sendo observado, aproximadamente 2 milimolar (mM)

em eritrócitos humanos e 10 mM em hepatócitos (Figura 11) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; MENDES; PEREIRA; DE ANGELIS-PEREIRA, 2020).

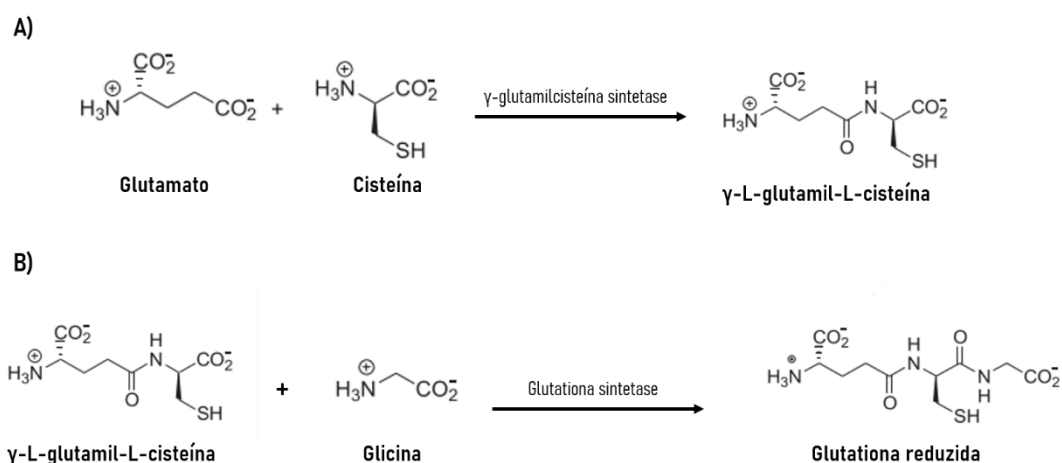
Figura 11 - Estrutura molecular da GSH



Fonte: SHARIFI-RAD *et al.*, 2020

Sua síntese ocorre no citoplasma de todas as células animais, essencialmente, nos hepatócitos e se dá a partir de 3 aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina. Inicialmente, há uma reação entre glutamato e cisteína catalisada pela enzima γ -glutamylcisteína sintetase formando uma ligação peptídica entre esses dois aminoácidos, gerando γ -L-glutamyl-L-cisteína (Figura 12- A). Em seguida, esse dipeptídeo se liga à glicina pela ação da enzima glutathione sintetase (Figura 12 - B). Essas reações requerem a participação de ATP (adenosina trifosfato) e íon magnésio (Mg^{+2}). (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008).

Figura 12 - Reação de síntese da glutathiona reduzida



Fonte: Adaptado de HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008

A glutathiona que é sintetizada no interior das células pode ser transportada para o meio extracelular com intermédio de difusão facilitada com a dependência da ação de transportadores. Grande parte do GSH presente no plasma é originado no fígado, entretanto, uma pequena parte pode ser proveniente da dieta e do intestino. Na membrana plasmática, há a presença da enzima γ -glutamyl-transpeptidase que converte GSH no intermediário γ -L-glutamyl-L-cisteína, permitindo que ele saia do fígado. Essa molécula, então, poderá ser captada pelos tecidos extra-hepáticos e convertida à GSH. Órgãos como rins, pulmão e intestino são os principais consumidores de GSH hepático (WU *et al.*, 2004).

Tanto a glicina quanto o glutamato são sintetizados e usados por muitas reações metabólicas e, por isso, apresentam altas concentrações no citosol. A cisteína citosólica é o substrato limitante da síntese de GSH por se apresentar em menores níveis no citoplasma. Essa molécula é originada a partir de 3 fontes: através do ciclo da metionina; da importação direta para a célula via plasma e pelo excesso de catabolismo de proteínas sobre a síntese protéica (REED *et al.*, 2008; HRISTOV, 2022).

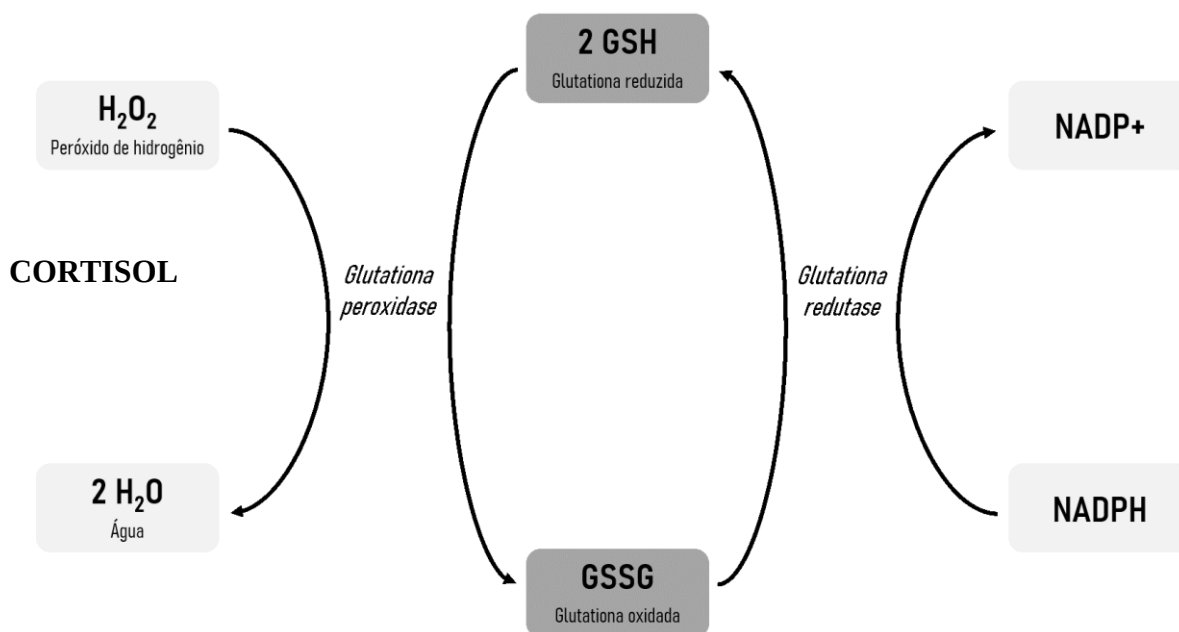
A enzima γ -glutamylcisteína sintetase é regulada por feedback negativo pela GSH fazendo com que não haja síntese exacerbada da enzima ou acúmulo da espécie intermediária γ -L-glutamyl-L-cisteína. Caso a conversão dessa espécie intermediária em GSH esteja insuficiente, há ação da enzima γ -glutamylciclotransferase que a converte em 5-oxoprolina, evitando seu acúmulo. A produção excessiva dessa última é observada em casos onde há deficiência hereditária da glutathione sintetase (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; HRISTOV, 2022).

A principal função da GSH é atuar como antioxidante ao neutralizar as espécies reativas antes que se liguem às biomoléculas, protegendo-as dos danos oxidativos. Essa molécula é capaz de frear a ação desses compostos tanto de forma direta quanto indireta por meio de reações enzimáticas (WU *et al.*, 2004; HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Sua capacidade redutora é fornecida pelo grupamento tiol (-SH) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Para que a atividade protetora contra as espécies oxidativas ocorra, é necessário que a molécula de GSH seja sempre regenerada através de um ciclo catalítico (Figura 13) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008). Após a exposição de GSH ao agente oxidante, ela é convertida à glutathiona oxidada (GSSG), sua forma oxidada. Esse processo é realizado pela enzima glutathiona peroxidase que, ao mesmo tempo, converte o peróxido de hidrogênio em água. A recuperação de GSH ocorre com a ação da enzima glutathiona redutase. Nesse processo, ao reduzir GSSG, a enzima requer a participação de NADPH que, ao doar 1 elétron, é convertida a NADP^+ , recuperando a molécula de GSH que está pronta, novamente, para entrar no ciclo de neutralização de espécies oxidativas (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; REED *et al.*, 2008; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020; HRISTOV, 2022).

Além da sua atuação como antioxidante, o GSH tem outras funções importantes no organismo. Ele atua na desintoxicação frente às toxinas, xenobióticos e algumas drogas. É, ainda, necessário na formação de prostaglandinas e leucotrienos, na ativação de linfócitos T, além do transporte de aminoácidos através das membranas celulares. Nota-se, por isso, que a molécula de GSH tem uma gama de atividades importantes ao organismo (WU *et al.*, 2004; REED *et al.*, 2008; HRISTOV, 2022).

Figura 13 - Ciclo de regeneração de GSH

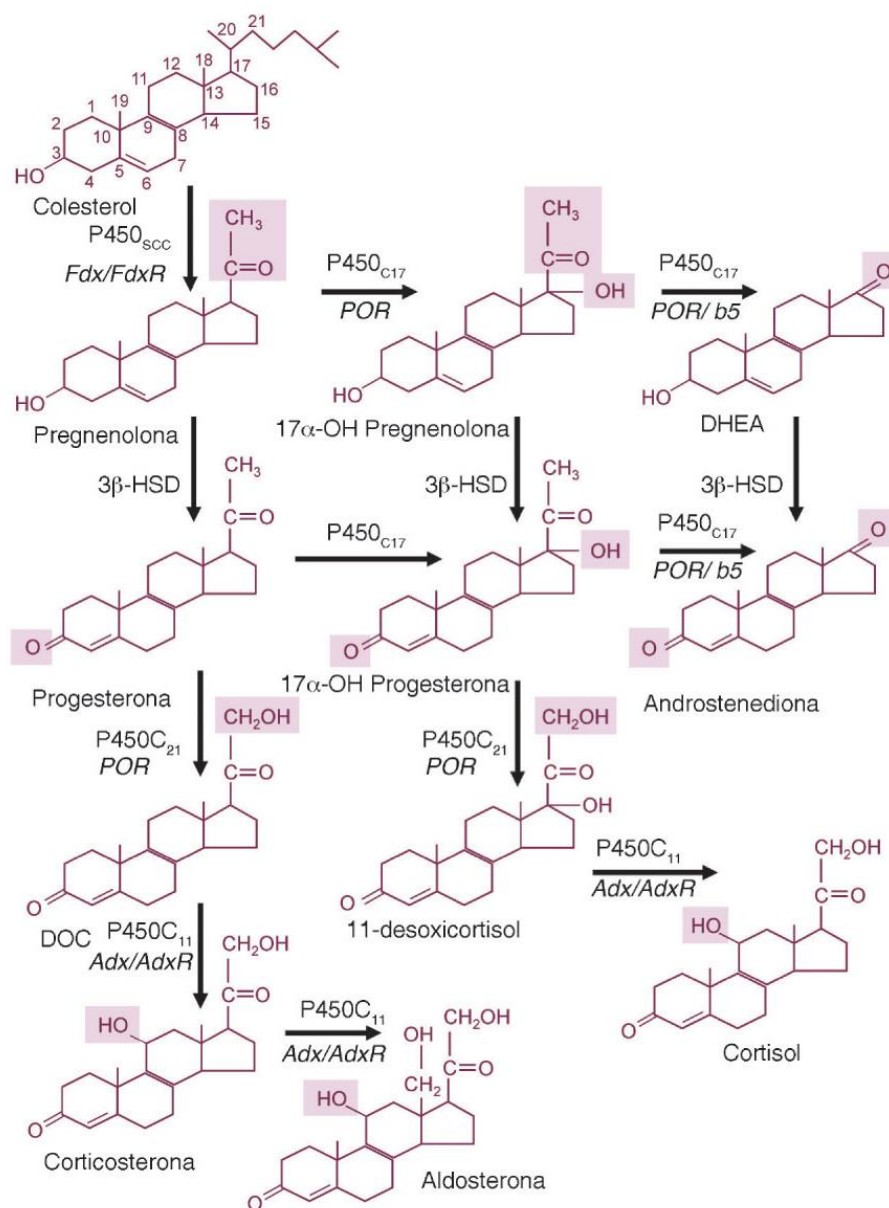


Fonte: Adaptado de SHARIFI-RAD et al., 2020

O cortisol é um glicocorticoide sintetizado predominantemente na zona fasciculada da região do córtex da glândula suprarrenal. O colesterol é a molécula precursora desse hormônio que, pela ação de diversas enzimas, é convertido à cortisol (Figura 14). As células nessa região possuem inúmeras gotículas de lipídios que armazenam os ésteres de colesterol. Elas têm a capacidade de sintetizar mais colesterol ou, ainda, importar lipoproteínas de baixa e alta densidade, LDL e HDL, respectivamente (MELMED *et al.*, 2016; DE MELLO AIRES, 2018).

O colesterol em seu estado livre pode ser convertido à cortisol, enquanto esterificado na forma armazenável. Ele então é convertido em pregnenolona pela ação da enzima CYP11A1 na mitocôndria. Após ser transportada ao retículo endoplasmático liso, a pregnenolona sofre a ação da enzima 3 β -HSD sendo convertida a progesterona. Essa última é convertida em 17-hidroxiprogesterona pela ação da CYP17. Pela ação da CYP21A2, ela é convertida à 11-desoxicortisol. Por fim, ao retornar para a mitocôndria, 11-desoxicortisol é convertido à cortisol pela CYP11B1. Há ainda, uma rota paralela que envolve a conversão de progesterona em 11-desoxicorticosterona e, finalizando, com a síntese de corticosterona. Essa rota não é de grande importância em humanos, mas em roedores a corticosterona é o principal glicocorticoide (MELMED *et al.*, 2016).

Figura 14 - Síntese de cortisol



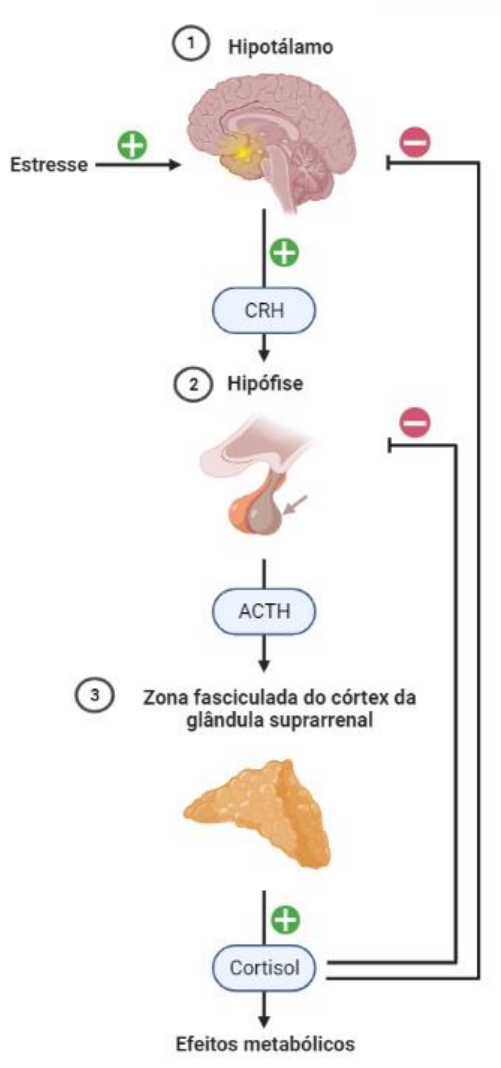
Fonte: DE MELLO AIRES, 2018

Quando sintetizado, o cortisol se difunde para fora das células suprarrenais e alcança o plasma. Grande parte do cortisol é transportado por uma globulina específica, a globulina transportadora de cortisol (CBG), também conhecida como transcortina. Essa molécula é sintetizada no fígado e possui alta afinidade pelo cortisol, por isso, aproximadamente 90% desse glicocorticoide é transportado por ela. Ainda, 5% está ligado à albumina, enquanto 5% circula em sua forma livre que é a responsável pelas ações fisiológicas do hormônio (MELMED *et al.*, 2016).

A inativação do cortisol ocorre no fígado, onde são reduzidos e conjugados com glicuronidas e sulfatos para que sejam excretados na urina pelos rins. A excreção do cortisol na urina pode ainda ocorrer na sua forma não metabolizada, constituindo o cortisol livre urinário. Existe também o mecanismo de inativação reversível do cortisol em cortisona, por ação da enzima 11β -HSD2. A meia vida do hormônio circulante é de aproximadamente 70 minutos (DE MELLO AIRES, 2018).

A secreção de cortisol é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Figura 15). Inicialmente, o hipotálamo secreta o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no sistema porta hipotálamo-hipofisário, sendo transportado até a adeno-hipófise. Ele irá estimular a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adeno-hipófise. O ACTH atua diretamente no córtex da suprarrenal promovendo a síntese e liberação do cortisol. Por feedback negativo, o cortisol atua inibindo a secreção tanto de ACTH quanto de CRH. Além disso, a secreção desse hormônio é contínua e tem relação com o ritmo circadiano. O pico da sua secreção é observado pela manhã diminuindo ao longo do dia. Fatores como estresse, citocinas inflamatórias, febre, queimadura, hipoglicemia, hipotensão arterial são condições que aumentam a secreção de cortisol (DE MELLO AIRES, 2018).

Figura 15 - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal



Fonte: A autora, 2023 – Criado em Biorender.com

As células nucleadas do corpo possuem receptores glicocorticoides que, na ausência do hormônio, encontram-se no citoplasma ligados a moléculas que lhes confere estabilidade. A ligação do cortisol ao receptor promove a liberação dessas moléculas estabilizadoras e o complexo cortisol-receptor é translocado para o núcleo. Nessa região da célula, o receptor ativado pela ligação com o hormônio interage com sequências específicas do DNA, denominadas de elemento responsivo aos glicocorticoides (GRE). Há então o estímulo para a transcrição dos genes responsivos aos glicocorticoides. Ressalta-se também que os receptores glicocorticoides podem reprimir a transcrição gênica pela sua ligação com elementos responsivos negativos aos glicocorticoides (nGRE), localizado na região promotora de genes

específicos, causando, por isso, a inibição da transcrição gênica (MELMED *et al.*, 2016; DE MELLO AIRES, 2018).

Os glicocorticoides apresentam funções em diversas rotas metabólicas, órgãos e sistemas do organismo, como: metabolismo de carboidratos, metabolismo de lipídios, metabolismo de proteínas, fígado, tecido muscular, tecido adiposo, sistema nervoso central, sistema imune, osso, rins, pele e outros. No metabolismo dos carboidratos, o cortisol age como contra-regulador da insulina protegendo o organismo contra a hipoglicemia. Esses hormônios estimulam a gliconeogênese hepática, aumentando a mobilização de substratos como aminoácidos e glicerol de tecidos periféricos para o fígado. Ainda, diminuem a utilização periférica de glicose atuando sobre os receptores de insulina e diminuindo os transportadores de glicose (MELMED *et al.*, 2016).

Em relação ao tecido adiposo, o cortisol pode estimular a diferenciação dos adipócitos, promovendo a adipogênese por meio da ativação da transcrição de diversos genes envolvidos nesse processo, contribuindo para a obesidade visceral. Ainda, há a ativação da lipólise que fornecerá substrato para gliconeogênese hepática (glicerol) e ácidos graxos livres como fonte de energia. No tecido muscular, observam-se alterações catabólicas com a inibição da síntese proteica e captação de aminoácidos para facilitar a gliconeogênese. Nos ossos, a exposição crônica a esses hormônios pode acarretar osteopenia e osteoporose com a inibição de algumas funções importantes exercidas pelos osteoblastos, como diferenciação e multiplicação celular. Ainda, diminuem a absorção intestinal e a reabsorção renal do íon cálcio, diminuindo a concentração sérica desse íon, aumentando a secreção de paratormônio que mobiliza cálcio dos ossos (DE MELLO AIRES, 2018).

Os efeitos anti-inflamatórios desse hormônio estão envolvidos na inibição da diferenciação de monócitos em macrófagos, da ação fagocítica dos macrófagos e de seu efeito citotóxico. Os glicocorticoides impedem as ações de histamina e plasminogênio reduzindo a resposta inflamatória local e, ainda, prejudicam a síntese de prostaglandinas ao induzir lipocortinas que irão inibir a atividade da enzima fosfolipase A2. Sua ação imunossupressora ocorre ao diminuir o número de linfócitos T circulantes e reduzindo a sua capacidade em migrar para o local onde há o estímulo antigênico. Junto a isso, promove atrofia do timo e de outros tecidos linfoides. No sistema nervoso central, os glicocorticoides influenciam o comportamento e humor do indivíduo, além de influenciar na memória e aprendizagem. (MELMED *et al.*, 2016; DE MELLO AIRES, 2018)

Tanto o excesso quanto a deficiência de cortisol são condições prejudiciais ao organismo porque as funções metabólicas não estarão em homeostase. O excesso de cortisol é

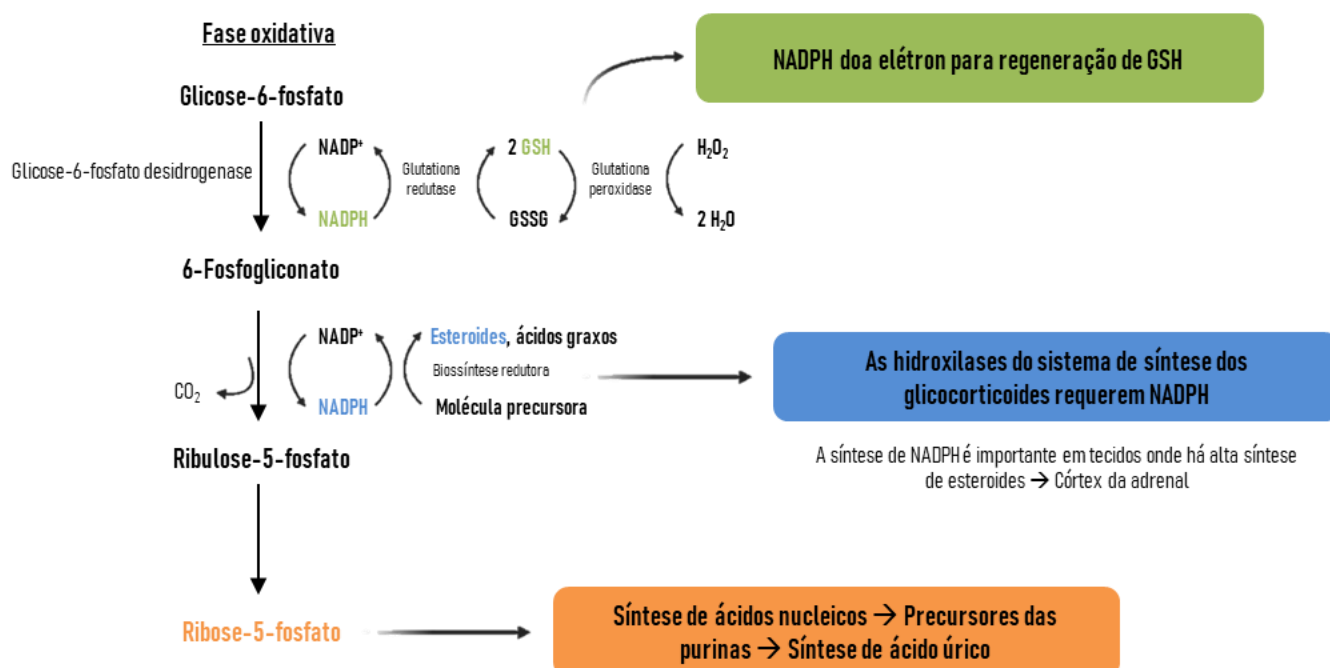
denominado hipercortisolismo e pode ocorrer por 3 causas comuns: tumor suprarrenal que secreta cortisol de forma autônoma (síndrome de Cushing; doença primária), não tendo controle e regulação pelo ACTH hipofisário; tumor hipofisário que secreta ACTH de modo autônomo induzindo a glândula suprarrenal a hipersecretar cortisol e não respondendo ao feedback negativo - doença de Cushing (origem secundária); hipercortisolismo iatrogênico que ocorre de forma secundária ao tratamento com cortisol. A fisionomia clássica de indivíduos nessa condição é pernas e braços finos, obesidade no tronco e rosto arredondado, apresentando bochechas proeminentes (DE MELLO AIRES, 2018).

A síndrome de Cushing é mais comum do que condições de hipocortisolismo, porém esse também é observado. A doença de Addison é a hipossecreção de todos os hormônios esteroides da suprarrenal, muitas vezes ocasionado após a destruição autoimune do córtex da suprarrenal (origem primária). Nesta situação, a liberação de ACTH se encontra aumentada. Alterações hereditárias nas enzimas atuantes na síntese de esteroides suprarrenais também podem causar hipossecreção. Nesse caso, pode ocorrer o excesso de secreção de androgênios, uma vez que o substrato irá acumular já que não poderá ser convertido a cortisol ou aldosterona, e será desviado para a síntese de androgênios (MELMED *et al.*, 2016).

RELAÇÃO ENTRE ÁCIDO ÚRICO, GSH E CORTISOL

A via das pentoses e fosfato consiste em uma rota catabólica alternativa para o consumo e utilização da glicose-6-fosfato sem a geração de ATP no citoplasma de algumas células. Essa via é composta por uma etapa oxidativa, onde há a degradação da glicose-6-fosfato com atuação de algumas enzimas, e a fase não-oxidativa que permite que as reações oxidativas sejam contínuas (STINCONE *et al.*, 2015).

Figura 16 - Fase oxidativa da via das pentoses-fosfato



Fonte: A autora, 2023

A oxidação da glicose-6-fosfato irá gerar intermediários biossintéticos importantes para as células, o NADPH, importante na síntese de GSH e em rotas de biossínteses redutoras, e ribose-5-fosfato que é precursor de nucleotídeos, coenzimas e ácido nucleicos (Figura 16). Na conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato há a formação de NADPH que pode fornecer elétrons para a regeneração do GSH. Na segunda reação, há a formação de mais espécies de NADPH que vão ser importantes na formação de esteroides, uma vez que as hidroxilases do sistema de sínteses dos glicocorticoides (cortisol) necessitam da participação dessa molécula. Por fim, a ribose-5-fosfato é precursora dos ácidos nucleicos. Esses são necessários a síntese de purinas que é precursora do ácido úrico. (STINCONE et al., 2015; GE et al., 2020)

Dessa forma, a via das pentoses-fosfato pode ser um elo entre esses três marcadores estudados nessa dissertação. Estando essa via mais ativada, espera-se observar um aumento nas concentrações dos mesmos.

JUSTIFICATIVA

Os ratos podem ser utilizados como modelos experimentais para o estudo de secreção salivar em humanos devido às semelhanças existentes na anatomia das glândulas salivares, sobretudo, em relação aos produtos secretores e o sistema de ductos. Além disso, a regulação da saliva é feita por neurotransmissores parassimpáticos (colinérgicos) e simpáticos (adrenérgicos) como nos humanos. Como em repouso o fluxo salivar é diminuído nesses animais, a administração de pilocarpina é viável para estimular a salivação (ROMERO, A. C.; IBUKI, F. K.; NOGUEIRA, F. N., 2012).

A coleta de pequenos volumes de sangue pode ser realizada pela veia safena e pela veia lateral da cauda do rato, entretanto, o volume de amostra limita as dosagens que podem ser realizadas “in vivo”. Portanto, para coletar volumes satisfatórios de sangue, o animal deve ser eutanasiado. Assim, uma correlação entre marcadores plasmáticos e salivares permitiria a substituição da coleta de sangue pela saliva, evitando a eutanásia dos animais (NOHARA *et al.*, 2016).

Em roedores, a literatura é escassa no que diz respeito a avaliação de marcadores salivares e sua correlação com o plasma. Alguns estudos desenvolvidos em roedores avaliam os marcadores nas glândulas salivares dos animais e, pra isso, o procedimento realizado é bastante invasivo ou requer a eutanásia para a coleta do material (FALKOWSKI *et al.*, 2018; ONOPIUK *et al.*, 2018, 2021; MACIEJCZYK *et al.*, 2019; ANNA *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2021). Além disso, não há acompanhamento do animal em diferentes idades proporcionando melhor entendimento das possíveis alterações dos marcadores salivares ao longo da vida. Portanto, a padronização da coleta de saliva de forma minimamente invasiva pode permitir que esses problemas sejam solucionados.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Padronizar a coleta de saliva em ratos da linhagem Wistar machos em diferentes idades e realizar a dosagem de ácido úrico, GSH e corticosterona nestas amostras.

1.2 Específicos

Em ratos de 35, 60 e 90 dias de vida, avaliar:

- Concentrações de ácido úrico salivar e plasmático;
- Concentrações de GSH salivar e plasmática;
- Concentrações de corticosterona salivar e plasmática.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Ética e modelo experimental

Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA nº 007/2020), conforme o anexo I. Todos os animais foram mantidos em biotério sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro escuro (7:00-19:00h), recebendo ração padrão para roedores e água *ad libitum*.

Para o desenvolvimento do trabalho, ratas Wistar fêmeas nulíparas adultas foram acasaladas na proporção de 2 fêmeas para cada macho. Após detectada a prenhez através da presença de plug vaginal e de espermatozoides no lavado vaginal, a fêmeas foram isoladas em caixa maternidade. Após o parto espontâneo, o tamanho da ninhada foi ajustado para 3 filhotes machos e 3 filhotes fêmeas. No 21º dia de vida, os animais foram desmamados e separados de acordo com o sexo. Nesse trabalho, foram mantidos apenas os animais machos. Utilizamos um total de 15 ninhadas (45 machos). Cada um deles foi escolhido de forma aleatória para ser sacrificado nas seguintes idades:

Puberdade – 35 dias (Grupo 35): $n = 15$;

Adulto jovem – 60 dias (Grupo 60): $n = 15$;

Adulto maduro – 90 dias (Grupo 90): $n = 15$.

Semanalmente, o ganho de peso corporal e consumo de ração foram avaliados.

2.2 Padronização da coleta de saliva

Inicialmente, foi realizado um teste pré-coleta de saliva adaptando os protocolos de Bernade e colaboradores (1956) e Costa (2009) onde os animais foram mantidos em jejum por 2 horas com acesso irrestrito à água. O animal foi anestesiado com xilazina (25 mg/kg de peso corporal, intramuscular, Dechra, Londrina, Brasil) e ketamina (45 mg/kg de peso corporal, intramuscular, Dechra, Londrina, Brasil). Após, para induzir a salivação, aplicou-se nitrato de pilocarpina (5 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal, Sigma-Aldrich, EUA). O animal foi posicionado em decúbito ventral com a boca apoiada sobre uma placa de petri e, a partir da queda da 1ª gota de saliva, marcou-se 15 minutos para a coleta. Com auxílio da pipeta, a saliva foi coletada e transferida para um microtubo de centrifugação. Após o tempo estipulado, o animal foi colocado em caixa individual com acesso a comida e água para

recuperação da anestesia. A amostra de saliva foi centrifugada a 10.000 rotações por minuto (rpm), a 4°C, durante 20 minutos.

Após o teste, foi realizada a coleta de saliva dos animais, entretanto, 4 animais foram à óbito apresentando características semelhantes à broncoaspiração. Dessa forma, foi testado outro protocolo de coleta de saliva adaptando a metodologia de Terregrossa e colaboradores (2014) e Martin e colaboradores (2018). O animal foi mantido em jejum por 2 horas com acesso liberado à água. Posteriormente, recebeu 200 µL da solução 0,03 M de ácido cítrico em 1 M de sacarose pipetado em sua boca, visto que a combinação de doce com azedo induz a salivação. Para evitar contaminação, após 60 segundos, a saliva do animal foi aspirada com uma pipeta e transferida para um microtubo de centrifugação. Esse processo foi repetido 20 vezes. No entanto, a quantidade de amostra coletada não foi suficiente, visto que, por estar acordado, o animal engolia a saliva.

Por isso, foi decidida a realização de novos testes utilizando pilocarpina para a definição de uma dose segura para o animal e que proporcionasse uma quantidade de amostra suficiente:

- a) Redução da dose de pilocarpina e diluição em solução salina – sem uso de anestesia: A dose de pilocarpina foi reduzida para 2,5 mg/kg e diluída em volume igual de solução salina.

Por exemplo: Um animal de 58 gramas recebeu 14,5 µL de pilocarpina diluída em 14,5 µL de solução salina.

O animal produziu saliva, entretanto, por estar acordado, ele engolia, impossibilitando a coleta de amostra suficiente.

O animal foi mantido isolado por um período para avaliação dos efeitos posteriores da substância. O mesmo apresentou boa recuperação, não ficou apático e, aparentemente, sem efeitos adversos ocasionados pela pilocarpina, como aumento de micção, de excreção fecal e de secreção nasal.

- b) Dose de pilocarpina reduzida e diluição em solução salina + redução da dose de anestésico: A dose de xilazina foi calculada na concentração de 25 mg/kg e, do volume ideal a ser aplicado, reduziu-se 10 µL. Dessa forma, a concentração recebida foi de 21,49 mg/kg.

Em relação à ketamina, a dose foi calculada na concentração de 45 mg/kg e, do volume ideal, reduziu-se 5 µL. Assim, a concentração recebida foi de 36,23 mg/kg.

Por exemplo: Um animal de 57 gramas receberia 71,25 µL de xilazina e 25,65 µL de ketamina, entretanto, buscando uma dose segura, recebeu 61,25 µL e 20,65 µL, respectivamente.

A dose de pilocarpina foi mantida em 2,5mg/kg diluída em volume igual de solução salina.

O animal apresentou boa salivação e quantidade de amostra suficiente.

Logo após a coleta de saliva, o animal apresentou alteração na respiração e secreção nasal. Administrou-se solução salina por gavagem e houve extravasamento de secreção, características de estar broncoaspirando.

- c) Dose de pilocarpina reduzida e diluição em solução salina + redução da dose de anestésico: A dose de xilazina foi reduzida para 10 mg/kg e de ketamina para 25 mg/kg.

A dose de pilocarpina foi mantida em 2,5mg/kg com a diluição no mesmo volume de solução salina.

Mesmo com a redução da dose, o animal apresentou características de estar anestesiado rapidamente. Além disso, o animal recobrou a consciência de forma rápida, apresentou boa salivação e quantidade de amostra suficiente.

- d) Nova redução da dose de pilocarpina e diluição em solução salina: Reduziu-se a dose de pilocarpina para 1,25 mg/kg que, ainda, foi diluída no dobro do volume de solução salina.

Por exemplo: Um animal de 62 gramas recebeu 7,75 µL de pilocarpina diluída em 15,5 µL de solução salina.

A concentração de xilazina se manteve em 10 mg/kg e de ketamina em 25 mg/kg.

O animal apresentou boa salivação e quantidade de amostra suficiente, assim como, nenhuma reação adversa e retornou rápido da anestesia.

- e) Dose de pilocarpina reduzida e diluição em solução salina + redução da dose de anestésico: A dose de xilazina foi reduzida para 5 mg/kg e de ketamina para 20 mg/kg. A dose de pilocarpina foi mantida em 1,25 mg/kg sendo diluída no o dobro do volume de solução salina.

Mesmo com a redução da dose, o animal apresentou características de estar anestesiado rapidamente. Além disso, recobrou a consciência de forma rápida, apresentou boa salivação e quantidade de amostra suficiente.

- f) Nova redução da dose de pilocarpina e diluição em solução salina: Reduziu-se a dose de pilocarpina para 0,625 mg/kg que, ainda, foi diluída em 75% do volume de solução salina.

Por exemplo: Um animal de 57 gramas recebeu 3,56 µL de pilocarpina diluída em 14,25 µL de solução salina.

A concentração de xilazina se manteve em 5 mg/kg e de ketamina em 20 mg/kg.

O animal demorou um pouco mais de tempo para liberar a primeira gota de saliva, entretanto, o volume final obtido foi satisfatório.

Os animais foram mantidos isolados, com água e comida a vontade, para serem observados no dia seguinte. Os mesmos apresentaram boas condições físicas indicando, assim, que os testes foram bem sucedidos.

Posteriormente, foi decidido a utilização do protocolo realizado no **teste e**: As doses de anestésico foram: xilazina - 5 mg/kg, com redução de 80% da dose inicial, e ketamina - 20 mg/kg, com redução de 55,5% da dose inicial.

A dose de pilocarpina foi de 1,25 mg/kg diluída no o dobro do volume de solução salina, havendo redução de 75% da dose inicial.

É importante ressaltar que alguns animais apresentaram pequenos efeitos adversos ocasionados pela administração da pilocarpina como, por exemplo, a liberação de urina durante a coleta. Isso ocorreu devido à estimulação do sistema nervoso parassimpático.

Assim, o protocolo de coleta de saliva adotado foi:

Os animais foram mantidos em jejum de dieta por 2 horas com acesso à água *ad libitum*. O animal foi anestesiado com xilazina (5 mg/kg de peso corporal, intramuscular, Dechra, Londrina, Brasil) e ketamina (20 mg/kg de peso corporal, intramuscular, Dechra, Londrina, Brasil). Após sinais claros de anestesia, para induzir a salivação, aplicou-se pilocarpina (1,25 mg/kg de peso corporal + diluição com 200% do volume com solução salina, intraperitoneal, Nitrato de pilocarpina, Sigma-Aldrich, EUA). O animal foi posicionado em decúbito ventral sobre gaze e papel toalha, para evitar o contato direto com a bancada fria, com a boca apoiada em uma placa de petri de forma a avaliar a formação da gota de saliva (Figuras 16, 17 e 18). Após 15 minutos da queda da 1ª gota, a saliva foi coletada com uma pipeta e armazenada em um microtubo de centrifugação sob gelo. Após esta manipulação, o animal foi colocado em caixa individual com acesso livre a comida e água para recuperação da anestesia. As amostras de saliva foram centrifugadas (10.000 rpm, 4°C,

20 minutos) e mantidas em freezer -20°C. Em todas as 3 idades, a coleta foi realizada às 10:00 h para evitar alterações do ciclo circadiano.

Figura 17 - Animal posicionado para coleta de saliva



Fonte: A autora, 2023

Figura 18 - Secreção salivar formada para coleta



Fonte: A autora, 2023

Figura 19 - Animal posicionado para coleta de saliva



Fonte: A autora, 2023

2.3 – Eutanásia e coleta de tecidos

Os animais de todos os grupos foram rapidamente eutanasiados por decaptação em guilhotina nas seguintes idades: 35, 60 e 90 dias. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas com oferta irrestrita de água. Eles foram pesados no dia do sacrifício, bem como foi medido o comprimento nasoanal (CNA) e aferido a glicemia de jejum com auxílio de glicosímetro portátil (ONETOUCH Select Plus Flex®, Johnson & Johnson Medical S. A., São Paulo, Brasil).

A coleta de sangue ocorreu em tubos heparinizados que, posteriormente, foram centrifugados (3000 rpm, 15 minutos, 4° C) para obtenção do plasma. Essas amostras foram mantidas em -20°C.

Os compartimentos de tecido adiposo branco (mesentérico, gonadal e retroperitoneal) e tecido adiposo marrom foram dissecados e pesados para avaliação de parâmetros biométricos e armazenados em -80°C. Os dados foram expressos em peso relativo ao animal ((peso do tecido X 100)/peso do animal).

2.4 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas em amostras de saliva e plasma.

2.4.1 Ácido úrico

A dosagem foi realizada por método enzimático colorimétrico utilizando kit comercial (BioclinTM; Minas Gerais, Brasil). O protocolo apresentado no kit foi adaptado para melhor análise das amostras. Foi realizado um teste com objetivo de avaliar se o aumento no volume de amostra utilizada iria prejudicar a leitura e os resultados uma vez que seria diferente da proporção apresentada e validada no protocolo original do kit. Após o teste, concluiu-se que a modificação de proporção não apresentou prejuízo à dosagem final.

Foram adicionados no tubo de ensaio 37,5 µL da amostra e 500 µL do reagente enzimático (DHBS < 10 mM, 4-Aminoantipirina < 10 mM, Peroxidase < 10,0 KU/L, Uricase < 10,0 KU/L, tampão, surfactante, estabilizantes e conservante). No tubo Padrão, adicionou-se 12,5 µL do reagente padrão (Ácido Úrico 6 mg/dL, tampão, estabilizante e conservante), 25 µL de tampão fosfato-salino (PBS) e 500 µL do reagente enzimático. No tubo Branco, adicionou-se 37,5 µL de PBS e 500 µL do reagente enzimático.

Todos os tubos foram bem homogeneizados, e permaneceram incubados em estufa a 37°C durante 5 min. A absorbância da amostra foi determinada em 505 nm em leitor de microplaca (INNO, LTEK Co., ltd), acertando o zero com branco e a leitura foi realizada em, no máximo, 30 min. A concentração foi determinada a partir do cálculo: ((Absorbância da Amostra x 6)/Absorbância do Padrão), e o resultado foi expresso em mg/ dL.

2.4.2 Glutathiona reduzida (GSH)

A dosagem de GSH foi realizada adaptando o protocolo de TIETZE, 1969. Em microtubo de centrifugação, adicionou-se 50 µL de amostra e 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 15%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 3500 rpm, a 10°C, por 10 minutos. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 50 µL do sobrenadante, 175 µL de tampão Tris-HCl (400 mM, pH = 8,9) e 25 µL de DTNB (2,5 mM) dissolvido em Tris-HCl (40mM, pH = 8,9). A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, a leitura foi realizada a 412 nm em um leitor de microplaca (INNO, LTEK Co., ltd).

2.4.3 Corticosterona

A dosagem de corticosterona livre foi realizada utilizando kit comercial de Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Enzo Life Sciences, Nova York, Estados Unidos. Corticosterone ELISA Kit, Catalog N. ADI-900-097). A sensibilidade do kit é 26,99 pg/mL. A diluição das amostras de plasma foi 1:40, enquanto as amostras de saliva não foram diluídas.

2.5 **Análises estatísticas**

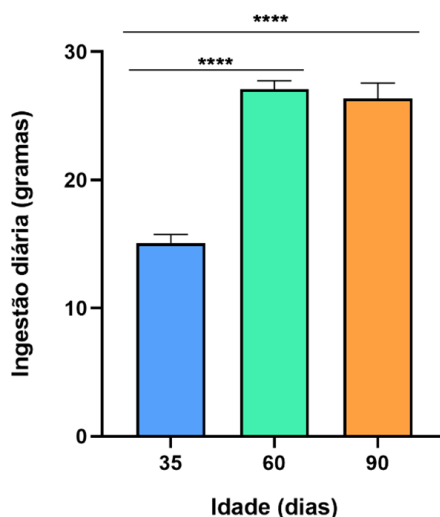
Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) One Way com pós teste de Tukey de comparações múltiplas, com intuito de comparar as médias dos grupos entre as diferentes idades. O teste de correlação de Pearson foi realizado para analisar os marcadores dosados em cada idade. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Para essas análises e confecção dos gráficos, utilizou-se o programa *GraphPad Prism* versão 8.02 para *Windows* (GraphPad Software©).

3 RESULTADOS

3.1 Consumo alimentar

Como demonstrado no gráfico 1, os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram ingestão alimentar maior do que o grupo 35 (80%, $p < 0,0001$; diferença média = -11,99; 75%, $p < 0,0001$; diferença média = -11,29, respectivamente).

Gráfico 1 - Consumo alimentar diário nas idades de 35, 60 e 90 dias

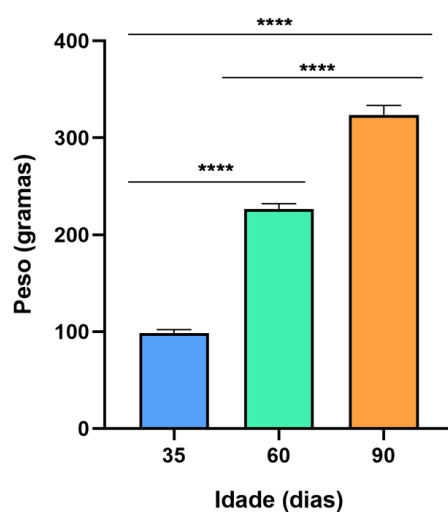


Legenda: Consumo alimentar diário, em gramas, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15); **** p -Valor $< 0,0001$.

3.2 Peso corporal

Os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram maior peso corporal comparados ao grupo 35 (130%, $p < 0,0001$, diferença média = -127,9; 229%, $p < 0,0001$, diferença média = -225,2, respectivamente; Gráfico 2). O peso corporal dos animais do grupo 90 foi 43% maior do que o grupo 60 ($p < 0,0001$, diferença média = -97,27, Gráfico 2).

Gráfico 2 - Peso corporal nas idades de 35, 60 e 90 dias

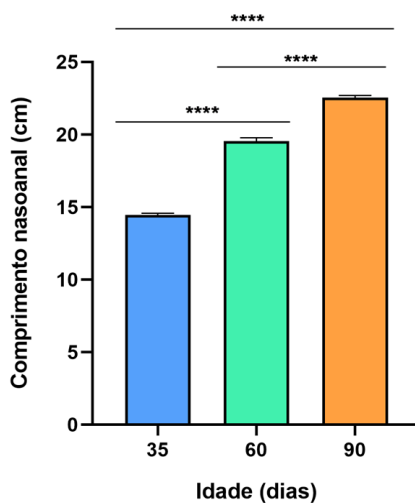


Legenda: Peso, em gramas, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15); **** p-Valor<0,0001.

3.3 Comprimento nasoanal

Como representado no gráfico 3, os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram CNA maior do que o grupo 35 (35%, $p < 0,0001$, diferença média = -5,101; 56%, $p < 0,0001$, diferença média = -8,101, respectivamente). O CNA dos animais do grupo 90 foi 15% maior do que o grupo 60 ($p < 0,0001$, diferença média = -3,000).

Gráfico 3 - Comprimento nasoanal nas idades de 35, 60 e 90 dias

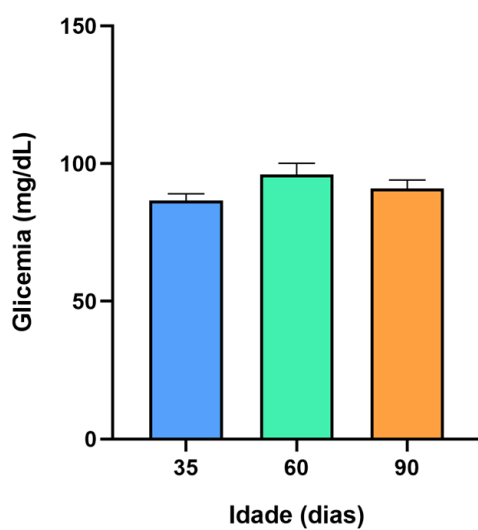


Legenda: Comprimento nasoanal, em centímetros, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15); **** p-Valor<0,0001.

3.4 Glicemia

Este parâmetro foi similar entre os grupos experimentais (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Glicemia nas idades de 35, 60 e 90 dias



Legenda: Glicemia, em mg/dL, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15)

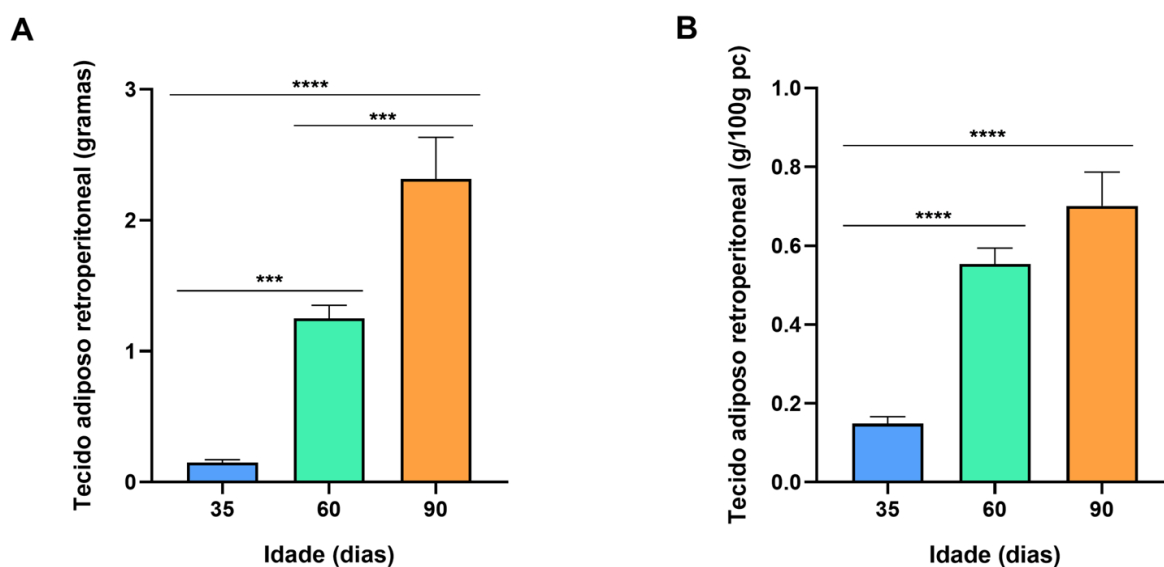
3.5 Depósitos de gordura

3.5.1 Peso do tecido adiposo branco (TAB) retroperitoneal

Os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram peso absoluto do TAB retroperitoneal maior do que o grupo 35 (735%, $p = 0,0008$, diferença média = -1,102; 1444%, $p < 0,0001$, diferença média = -2,166, respectivamente; Gráfico 5-A). O peso absoluto do TAB retroperitoneal dos animais do grupo 90 foi 85% maior do que o grupo 60 ($p = 0,0009$, diferença média = -1,064; Gráfico 5-A).

Os animais do grupo 60 e 90 apresentaram o peso relativo do TAB retroperitoneal maior do que o grupo 35 (272%, $p < 0,0001$, diferença média = -0,4048; 372% $p < 0,0001$, diferença média = -0,5520; Gráfico 5-B).

Gráfico 5 - Peso absoluto e relativo de TAB retroperitoneal nas idades de 35, 60 e 90 dias



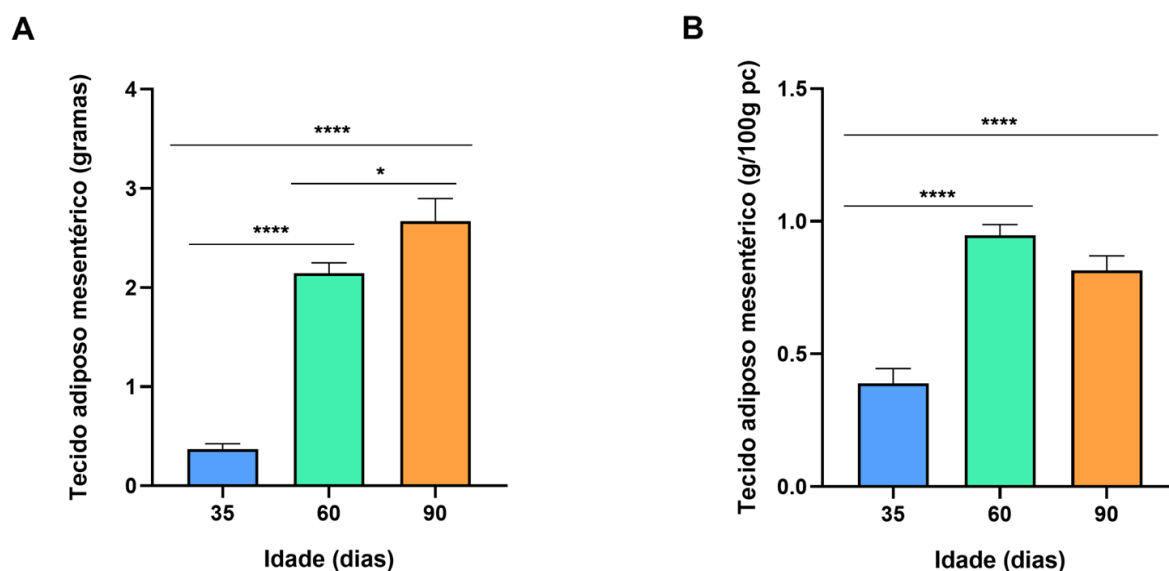
Legenda: A – Peso absoluto de TAB retroperitoneal, em gramas, nas idades de 35 ($n = 13$), 60 ($n = 15$) e 90 dias ($n = 14$); B – Peso relativo de TAB retroperitoneal, em gramas por 100 gramas de peso corporal, nas idades de 35 ($n = 13$), 60 ($n = 15$) e 90 dias ($n = 14$); *** p -Valor $< 0,05$; **** p -Valor $< 0,0001$.

3.5.2 Peso do TAB mesentérico

Como demonstrado no gráfico 6-A, os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram peso absoluto do TAB mesentérico maior do que o grupo 35 (477%, $p < 0,0001$, diferença média = -1,773; 618%, $p < 0,0001$, diferença média = -2,299).

Os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram o peso relativo do TAB mesentérico maior do que o grupo 35 (144%, $p < 0,0001$, diferença média = -0,5588; 618%, $p < 0,0001$, diferença média = -0,4255; Gráfico 6-B).

Gráfico 6 - Peso absoluto e relativo de TAB mesentérico nas idades de 35, 60 e 90 dias



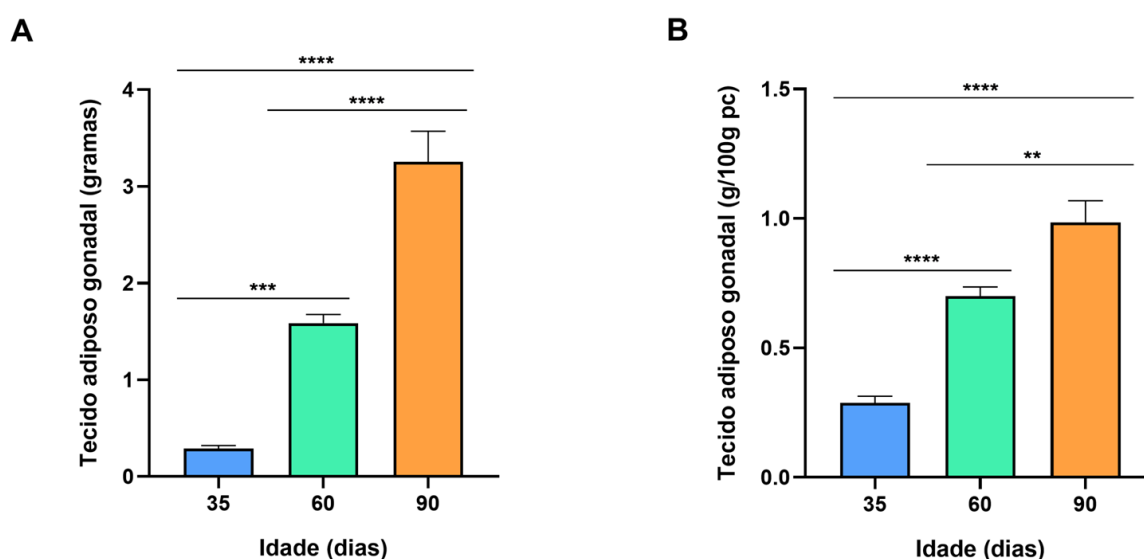
Legenda: A – Peso absoluto de TAB mesentérico, em gramas, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15); B – Peso relativo de TAB mesentérico, em gramas por 100 gramas de peso corporal, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15); *p-Valor < 0,05; ****p-Valor < 0,0001.

3.5.3 Peso do TAB epididimal

Os animais dos grupos 60 e 90 apresentaram peso absoluto do TAB epididimal maior quando comparados ao grupo 35 (447,5%, $p = 0,0002$, diferença média = -1,296; 1024%, $p < 0,0001$, diferença média = -2,964; Gráfico 7-A). O peso absoluto do TAB epididimal dos animais do grupo 90 foi 105,3% maior do que o grupo 60 ($p < 0,0001$, diferença média = -1,669; Gráfico 7-A).

Como demonstrado no gráfico 7-B, o peso relativo do TAB epididimal dos animais dos grupos 60 e 90 foi 143% e 242% maior do que o grupo 35, respectivamente ($p < 0,0001$, diferença média = -0,4118 e -0,6968, respectivamente). Este parâmetro foi 40% maior no grupo 90 comparado ao grupo 35 ($p = 0,0021$, diferença média = -0,2850).

Gráfico 7 - Peso absoluto e relativo de TAB epididimal nas idades de 35, 60 e 90 dias



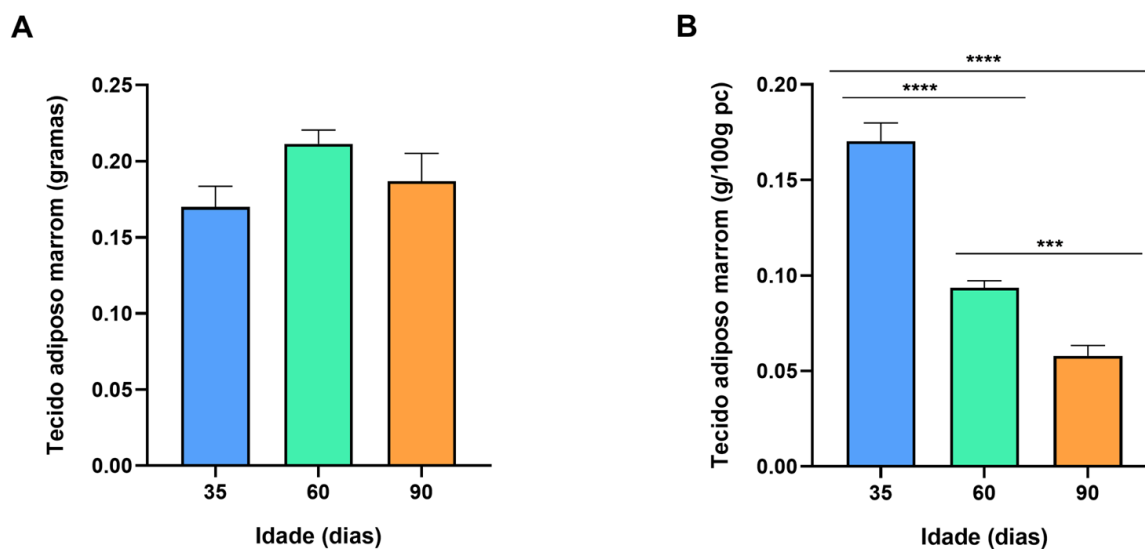
Legenda: A – Peso absoluto de tecido adiposo branco epididimal, em gramas, nas idades de 35 ($n = 13$), 60 ($n = 15$) e 90 dias ($n = 15$); B – Peso relativo de tecido adiposo branco gonadal, em gramas por 100 gramas de peso corporal, nas idades de 35 ($n = 13$), 60 ($n = 15$) e 90 dias ($n = 15$); ** p -Valor $< 0,05$; *** p -Valor $< 0,05$; **** p -Valor $< 0,0001$.

3.5.4 Peso do tecido adiposo marrom (TAM)

O peso absoluto do TAM foi similar entre os grupos (Gráfico 8-A).

Observamos que o peso relativo do TAM dos grupos 60 e 90 foi 45% e 65% menor do que o grupo 35, respectivamente ($p < 0,0001$, diferença média = 0,07672, $p < 0,0001$, diferença média = 0,1123, respectivamente; Gráfico 8-B). O grupo 90 apresentou peso relativo do TAM 38% menor do que o grupo 60 ($p = 0,0008$, diferença média = 0,03562; Gráfico 8-B).

Gráfico 8 - Peso absoluto e relativo do TAM nas idades de 35, 60 e 90 dias



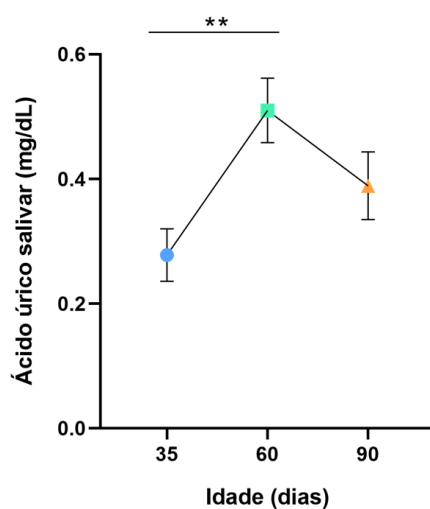
Legenda: A – Peso absoluto de tecido adiposo marrom, em gramas, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 14); B – Peso relativo de tecido adiposo marrom, em gramas por 100 gramas de peso corporal, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 14); ***p-Valor < 0,05; ****p-Valor < 0,0001.

3.6 Ácido úrico

3.6.1 Ácido úrico salivar

Observamos que a concentração de ácido úrico salivar no grupo 60 foi 82% maior do que o grupo 35 ($p = 0,0057$, diferença média = -0,2321; Gráfico 9).

Gráfico 9 - Concentração de ácido úrico salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias

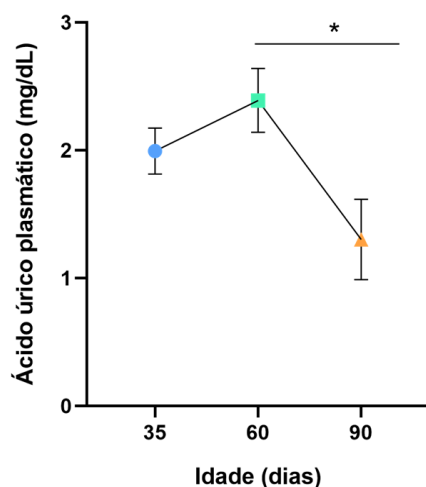


Legenda: Ácido úrico salivar, em mg/dL, nas idades de 35 ($n = 13$), 60 ($n = 15$) e 90 dias ($n = 13$); **p-Valor < 0,05

3.6.2 Ácido úrico plasmático

No plasma, a concentração de ácido úrico no grupo 90 foi 46% menor do que o grupo 60 ($p = 0,0119$, diferença média = -1,088; Gráfico 10).

Gráfico 10 - Concentração de ácido úrico plasmático nas idades de 35, 60 e 90 dias



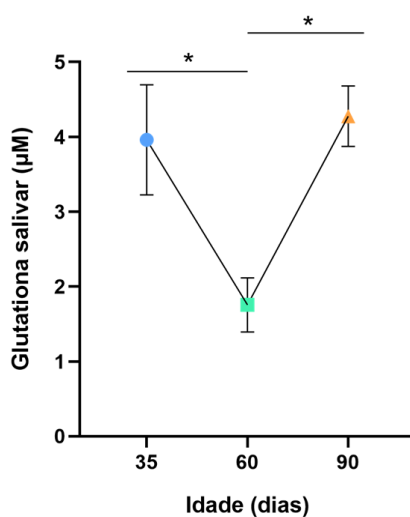
Legenda: Ácido úrico plasmático, em mg/dL, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 15); *p-Valor < 0,05

3.7 Glutathiona reduzida (GSH)

3.7.1 GSH salivar

Observamos concentração menor de GSH na saliva dos animais do grupo 60 do que os grupos 35 e 90 (56% , p = 0,0264, diferença média = 2,206; 59%, p = 0,0101, diferença média = -2,522, respectivamente; Gráfico 11).

Gráfico 11 - Concentração de GSH salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias

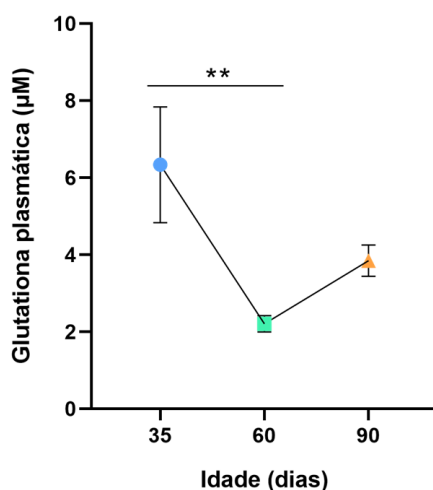


Legenda: GSH salivar, em µM, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 13); *p-Valor < 0,05

3.7.2 GSH plasmática

A concentração de GSH no plasma foi 65% menor no grupo 60 do que no grupo 35 ($p = 0,0075$, diferença média = 4,128; Gráfico 12).

Gráfico 12 - Concentração de GSH plasmática nas idades de 35, 60 e 90 dias



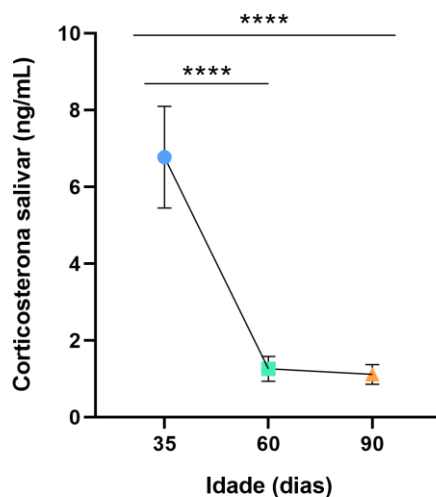
Legenda: Glutathiona reduzida plasmática, em μM , nas idades de 35 ($n = 13$), 60 ($n = 15$) e 90 dias ($n = 13$); ** p -Valor $< 0,05$

3.8 Corticosterona

3.8.1 Corticosterona salivar

A concentração de corticosterona salivar foi 81% e 84% menor no grupo 60 e 90 comparados ao grupo 35, respectivamente ($p < 0,0001$, diferença média = 5,512; $p < 0,0001$, diferença média = 5,657, respectivamente; Gráfico 13).

Gráfico 13 - Concentração de corticosterona salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias

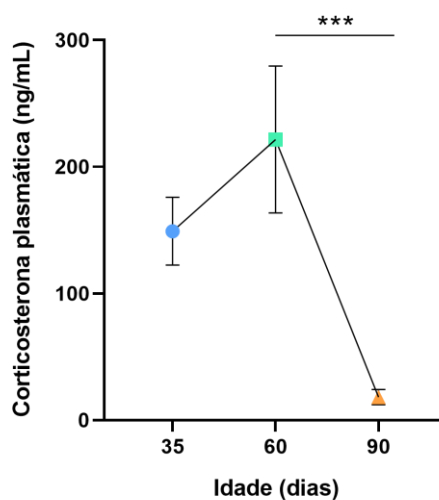


Legenda: Corticosterona salivar, em ng/mL, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 13); ****p-Valor < 0,0001

3.8.2 Corticosterona plasmática

Já a concentração de corticosterona plasmática, foi 92% maior no grupo 90 comparado ao grupo 60 ($p = 0,0010$, diferença média = 203,3; Gráfico 14).

Gráfico 14 - Concentração de corticosterona salivar nas idades de 35, 60 e 90 dias



Legenda: Corticosterona plasmática, em ng/mL, nas idades de 35 (n = 13), 60 (n = 15) e 90 dias (n = 13); ***p-Valor = 0,0010

Observamos que existe correlação entre os marcadores salivares ácido úrico e corticosterona no grupo 60 (Tabela 12). Entretanto, não foi observada correlação entre esses e a GSH ou entre os marcadores plasmáticos desse grupo (Tabela 12).

Nos grupos 35 e 90, não foram observadas correlações entre os diferentes marcadores do mesmo tipo de amostra (saliva vs saliva; plasma vs plasma; Tabela 21 e Tabela 3) e entre os mesmos marcadores de amostras diferentes (saliva vs plasma; Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 1 - Correlação entre os marcadores salivares e plasmáticos no grupo 35

Grupo 35				
Marcador salivar	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico/GSH	0,5139	-0,05174 a 0,8299	0,2641	0,0724
Ácido úrico/Corticosterona	-0,2623	-0,8479 a -0,6115	0,06882	0,5698
GSH /Corticosterona	-0,0944	-0,7912 a 0,7091	0,008916	0,8404
Marcador plasmático	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico/GSH	-0,095	-0,6138 a 0,4812	0,009022	0,7576
Ácido úrico/Corticosterona	-0,2368	-0,8401 a 0,6283	0,05607	0,6092
GSH/Corticosterona	0,2054	-0,6138 a 0,8301	0,04217	0,6587

Tabela 2 - Correlação entre os marcadores salivares e plasmáticos no grupo 60

Grupo 60				
Marcador salivar	r	Intervalo de	r	p-Valor

		confiança	quadrado	
Ácido úrico/GSH	0,5053	-0,1823 a 0,8610	0,2553	0,1363
Ácido úrico/Corticoesterona	-0,8928	-0,9806 a -0,5073	0,7971	0,0028*
GSH/Corticoesterona	-0,7534	-0,9826 a 0,3842	0,5677	0,1414

Marcador plasmático	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico/GSH	0,4687	-0,1110 a 0,8104	0,2197	0,1062
Ácido úrico/Corticoesterona	-0,5065	-0,9118 a 0,3986	0,2565	0,2461
GSH/Corticoesterona	0,6767	-0,2992 a 0,9607	0,4579	0,1399

Legenda: *p-valor < 0,05

Tabela 3 - Correlação entre os marcadores salivares e plasmáticos no grupo 90

Grupo 90				
Marcador salivar	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico/GSH	-0,2387	-0,6979 a 0,3596	0,05697	0,4323
Ácido úrico/Corticoesterona	-0,4465	-0,8977 a 0,4619	0,1994	0,3152
GSH/Corticoesterona	0,3403	-0,5550 a 0,8703	0,1158	0,4552

Marcador plasmático	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico/GSH	-0,4918	-0,8204 a 0,08124	0,2418	0,0879
Ácido úrico/Corticoesterona	-0,2404	-0,8082 a 0,5590	0,05779	0,5663
GSH/Corticoesterona	0,3934	-0,5111 a 0,8844	0,1547	0,3826

Tabela 4 - Correlação saliva e plasma no grupo 35

Grupo 35				
Marcador	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico	-0,2382	-0,6976 a 0,3600	0,05674	0,4332
GSH	-0,3078	-0,7343 a 0,2928	0,09476	0,3062
Corticosterona	0,2037	-0,4886 a 0,7386	0,04149	0,5725

Tabela 5 - Correlação saliva e plasma no grupo 60

Grupo 60				
Marcador	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico	-0,1387	-0,6078 a 0,4022	0,01923	0,6221
GSH	-0,4419	-0,8551 a 0,3146	0,1953	0,2337
Corticosterona	-0,3385	-0,7640 a 0,2921	0,1146	0,2818

Tabela 6 - Correlação saliva e plasma no grupo 90

Grupo 90				
Marcador	r	Intervalo de confiança	r quadrado	p-Valor
Ácido úrico	-0,4443	-0,7995 a 0,1413	0,1974	0,1283
GSH	-0,127	-0,6336 a 0,4559	0,01613	0,6793

Corticosterona	-0,1415	-0,6424 a 0,4442	0,02001	0,6448
-----------------------	---------	------------------	---------	--------

4 DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento dessa dissertação utilizamos animais eutróficos e saudáveis durante três fases da vida: 35 dias, que corresponde a puberdade; 60 dias, início da fase adulta com a maturação sexual e 90 dias, adulto maduro. Dessa forma, os resultados relativos ao consumo alimentar, glicemia e os parâmetros biométricos são condizentes com animais eutróficos e normais.

Para os três marcadores estudados, observamos que as concentrações são maiores no plasma do que na saliva. Inferindo-se, portanto, que pouco do que é sintetizado no plasma é secretado no fluido salivar. As possíveis discrepâncias observadas entre os perfis salivares e plasmáticos podem ser atribuídas à cinética de transporte. O ácido úrico, por exemplo, apresenta esse mecanismo de transporte descrito via proteína URAT-1 (LI *et al*, 2019).

A concentração de GSH indica tendência a um perfil similar na saliva e no plasma. No grupo 60 é observada menor concentração desse marcador em relação ao grupo 35. No grupo 90 é observado valores maiores do que o grupo 60. A concentração de ácido úrico também apresenta essa tendência similar nos dois fluidos ao longo das 3 idades. No grupo 60 observamos maior concentração de ácido úrico em relação ao grupo 35. No grupo 90, observamos menor concentração em relação ao grupo 60. Os baixos valores de ácido úrico observados no grupo 90 podem estar relacionados com maior atividade da enzima uricase, responsável pela metabolização a alantoína, pós-maturação sexual (ÁLVAREZ-LARIO; MACARRÓN-VICENTE, 2010).

Tanto GSH quanto ácido úrico apresentam importante papel antioxidante frente as espécies reativas. Dessa forma, baixos níveis de GSH podem ser um fator crítico na neutralização de espécies reativas, favorecendo a instalação de um ambiente de estresse oxidativo. Ao passo que altos níveis de ácido úrico poderiam atuar como um mecanismo compensatório aos 60 dias frente à baixa concentração de GSH para neutralizar as espécies reativas. Observa-se, assim, um possível cross-talk entre GSH e ácido úrico, onde mesmo por vias metabólicas independentes, esses dois marcadores se relacionam.

Além disso, é discutido na literatura a respeito dos efeitos do ácido úrico no desenvolvimento neural/cognitivo, o que pode ser corroborado pelos dados dessa dissertação com os níveis de ácido úrico salivar e plasmático maiores no grupo 60, indicando maturação dos animais (MIJAILOVIC *et al*, 2022; FANG *et al.*, 2014; ÁLVAREZ-LARIO; MACARRÓN-VICENTE, 2010).

O comportamento da corticosterona apresenta diferença entre saliva e plasma. Na saliva, observamos menor concentração desse marcador no grupo 60 em relação ao grupo 35. Ainda, há uma ligeira queda no grupo 90 dias em relação ao grupo 60 dias. Enquanto no plasma, há maior concentração no grupo 60 em comparação com o grupo 35 e uma queda acentuada no grupo 90 dias em comparação com o grupo 60.

A diminuição na concentração de corticosterona no plasma pode ter relação com a menor necessidade gliconeogênica pós-lactação, onde a gordura é obtida pelo leite materno (BROWN *et al.*, 2002) e pós-maturação sexual, já que o animal apresenta maiores estoques de glicogênio e gordura (BANERJEE *et al.*, 1997). A diferença observada na concentração desse marcador entre a saliva e o plasma pode ser atribuída à modulação nas concentrações da globulina ligadora de cortisol (ROMERO *et al.*, 2013).

Foi observada correlação entre ácido úrico e corticosterona salivar no grupo 60. Nessa idade, observa-se aumento de ácido úrico e queda de corticosterona nesse fluido. Não podemos assumir que há uma relação de causa e efeito nessa correlação, no entanto, podemos pensar em algumas ações isoladas e antagônicas dessas substâncias para tentar explicar essa correlação. Alguns estudos mostram uma ação inflamatória do ácido úrico que pode ativar vias que secretam diversas citocinas e moléculas inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2017; SPIGA *et al.*, 2017). Em contrapartida, uma ação notável dos glicocorticoides é seu efeito anti-inflamatório reduzindo respostas inflamatórias, inibindo a síntese de substâncias inflamatórias e a diferenciação de monócitos em macrófagos (MELMED *et al.*, 2016).

Em humanos, já é bastante documentada a utilização do fluido salivar na avaliação desses 3 marcadores. O ácido úrico salivar é o principal neutralizador de espécies reativas nesse fluido e um dos principais antioxidantes plasmáticos. É observado em humanos, que a avaliação do ácido úrico salivar pode ser um indicador robusto da atividade sistêmica dessa molécula. Isso porque existe uma correlação positiva significativa entre as concentrações de ácido úrico salivar e sérico (SHIBASAKI *et al.*, 2012; SOUKUP *et al.*, 2012; RIIS *et al.*, 2018; VERNEROVÁ *et al.*, 2021). Em ratos, não foram encontrados trabalhos que avaliam esse marcador na saliva e ainda são escassos aqueles que avaliam esse marcador no plasma.

Como a literatura é escassa no que diz respeito a avaliação dos marcadores salivares e plasmáticos dosados nessa dissertação, para discutir nossos dados selecionamos autores que trabalharam com modelos experimentais diversos, mas levamos em consideração os dados apenas dos grupos controle, que não passaram por nenhuma intervenção e estavam consumindo dieta padrão.

Zalewska e colaboradores (2020) estudaram durante 10 semanas ratos Wistar machos sexualmente maduros. Avaliaram se a hiperglicemia induzida por dieta hiperlipídica e o estresse oxidativo das glândulas salivares poderiam ser evitados pela administração de N-acetilcisteína. O grupo controle (n = 10) apresentou ácido úrico plasmático $0,3067 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. A dosagem de ácido úrico também foi realizada como nessa dissertação e o resultado foi apresentado em relação à quantidade de proteínas, diferente do apresentado nesse trabalho, impossibilitando a comparação direta dos dados.

Kołodziej e colaboradores (2017) trabalharam com ratos Wistar machos com peso inicial de 67 a 72 gramas pelo período de 8 semanas. Eles avaliaram se a exposição crônica à dieta hiperproteica causaria disfunções nas glândulas salivares. Os animais (n = 8) apresentaram a concentração de ácido úrico plasmático = $4,0 \text{ ng}/\text{mg}$ de proteína, variando de $1,0$ a $4,3 \text{ ng}/\text{mg}$ de proteína. O protocolo para dosagem desse marcador foi semelhante ao utilizado nessa dissertação e os resultados não podem ser comparados devido a diferença de unidade de apresentação dos dados.

Maciejczyk e colaboradores (2018) trabalharam com ratos Wistar machos com idade de 6 semanas por um período de 8 semanas. Avaliaram se a ingestão crônica de dieta com altos níveis de sacarose resulta em estresse oxidativo nas glândulas salivares. O ácido úrico plasmático no grupo (n = 10) variou entre $0,3$ a $0,6 \mu\text{g}/100\text{mg}$ de proteína. A dosagem desse marcador foi feita de forma similar à essa dissertação, mas o resultado apresentado com unidade diferente.

Falkowski e colaboradores (2018) trabalharam com ratos Wistar machos com idade de 14 meses. Avaliaram se a administração do suplemento Whey Protein alteraria os antioxidantes presentes nas glândulas salivares de ratos idosos. Consideramos apenas os 2 grupos controles, a diferença entre eles consistiu no dia do sacrifício, C7 (n = 10) foi sacrificado 7 dias após o início do experimento, enquanto C14 (n = 10), 14 dias após o início. O ácido úrico plasmático de C7 = $29 \pm 4,6 \mu\text{mol}/\text{L}$, C14 = $28 \pm 5,4 \mu\text{mol}/\text{L}$. A dosagem desse marcador foi feita de forma similar à essa dissertação.

Conforme antes mencionado, não foram encontrados estudos que avaliaram a concentração de ácido úrico no fluido salivar de roedores, enquanto poucos trabalhos analisaram este marcador nas glândulas salivares (KOŁODZIEJ *et al.*, 2017; MACIEJCZYK *et al.*, 2018; ZALEWSKA *et al.*, 2020). O mesmo foi observado para o plasma.

A GSH é outro importante antioxidante presente na saliva, que auxilia o ácido úrico na neutralização das espécies reativas nesse fluido. Estudos em humanos que investigam, sobretudo, condições relacionadas ao estresse oxidativo, avaliam esse marcador na saliva

(OZTÜRK *et al.*, 2008; ARANA *et al.*, 2017; NGAMCHUEA *et al.*, 2018; KLIMIUK *et al.*, 2020; DERINDAĞ *et al.*, 2021). Foram encontrados poucos estudos que avaliaram a GSH no fluido salivar e no plasma de ratos.

Maciejczyk e colaboradores (2021) publicaram o único trabalho encontrado que analisou o fluido salivar. Utilizaram ratos Wistar machos, não foi informado a idade dos animais mas apresentavam peso inicial entre 50 e 60 gramas e foram acompanhados por 8 semanas. Avaliaram a utilidade clínica de antioxidantes salivares e produtos de estresse oxidativo em um estudo pré-clínico em animais resistentes à insulina.

Para a coleta de saliva, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas, anestesiados com fenobarbital sódico (80mg/kg peso corporal, via intraperitoneal) e a indução de salivação foi feita com nitrato de pilocarpina em soro fisiológico (5 mg/kg peso corporal, via intraperitoneal). Uma bola de algodão foi inserida na boca do animal pelo período de 5 minutos.

Assim como nessa dissertação, o grupo não observou correlação entre ácido úrico salivar e GSH salivar.

A utilização da GSH apresentou sensibilidade e especificidade de 100% tanto para plasma, quanto para saliva. Já ácido úrico, apresentou 80% nesses parâmetros, também nos dois fluidos estudados. Nesse trabalho, a dosagem desses dois marcadores foi realizada da mesma forma que nessa dissertação.

Maciejczyk e colaboradores (2019), em um novo estudo trabalharam com ratos Wistar machos de 8 semanas de idade. Avaliaram a função secretora, os parâmetros de estresse oxidativo e antioxidantes das glândulas salivares de animais com pancreatite aguda. O grupo (n = 9) apresentou GSH plasmática de 2,316 +/- 0,2375 ng/mg de proteína. A dosagem de GSH também foi realizada como nessa dissertação, entretanto, o resultado foi apresentado em relação à quantidade de proteínas, o que não permite comparação com os valores observados.

Żukowski e colaboradores (2018) estudaram ratos Wistar machos com 4 semanas de idade, por 2 meses. Avaliaram os efeitos da N-acetilcisteína em ratos alimentados de forma crônica com dieta hiperlipídica, contra danos oxidativos e prevenção de disfunção nas glândulas salivares. O grupo controle (n = 10) apresentou GSH plasmática de 0,72 ng/mg de proteína (mínimo = 0,55 ng/mg de proteína; máximo = 0,92 ng/miligramma de proteína). A dosagem de GSH também foi realizada como nessa dissertação, entretanto, o resultado foi apresentado em relação à quantidade de proteínas, o que não permite comparação com os valores observados.

Zalewska e colaboradores (2020) também dosaram GSH. O grupo controle ($n = 10$) apresentou GSH plasmática de $0,7101 \pm 0,1$ ng/mg de proteína. A dosagem de GSH foi realizada como nessa dissertação e o resultado também foi apresentado em relação à quantidade de proteínas, como no estudo anterior.

Gyurászová e colaboradores (2018) trabalharam com camundongos fêmeas e machos, adultos e saudáveis. Buscaram estabelecer valores de referência para marcadores de estresse oxidativo no plasma, urina e saliva desses animais. Para a coleta de saliva, os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg peso corporal, via intraperitoneal) e xilazina (10 mg/kg peso corporal, via intraperitoneal), em seguida, administrou-se pilocarpina (0,5 µg/kg peso corporal). A saliva foi coletada durante 30 minutos. Nesse trabalho, não foi dosado a GSH como feito nessa dissertação, mas a razão GSH/GSSG. Nas fêmeas, observou-se essa razão salivar variando entre 1,55 – 3,98, enquanto nos machos variou entre 0,88 – 2,86. Observaram também que o aumento da idade levou a redução da razão GSH/GSSG na saliva. Por fim, não houve correlação entre esse marcador na saliva e no plasma.

Observa-se, portanto, que mesmo com a existência de literatura recente avaliando GSH no plasma, são necessários mais estudos para novos esclarecimentos acerca desse marcador antioxidante. Junto a isso, trabalhos avaliando esse marcador no fluido salivar são escassos, sendo que poucos analisam a GSH no conteúdo da glândula salivar.

Em humanos, o cortisol que chega à saliva é a fração livre, a molécula ativa que tem a capacidade de atravessar a membrana celular para se ligar aos receptores intracelulares e induzir as alterações metabólicas. Essa fração chega à saliva por meio do processo de difusão. A concentração de cortisol não varia com a quantidade de saliva e reflete muito bem a fração livre de cortisol no soro. Por isso, a dosagem desse marcador na saliva humano é uma alternativa prática e confiável (LEWIS, 2006; LØVÅS; HUSEBYE, 2007; CLEMENTS, 2013; ANDREAZZI *et al.*, 2020). Em ratos, poucos estudos avaliam a corticosterona salivar.

Nohara e colaboradores (2016) trabalharam com camundongos de idade entre 9 e 13 semanas. Inicialmente, avaliaram se o glicocorticoide exógeno administrado seria transferido do sangue para saliva e compararam os níveis de corticosterona nesses dois fluidos. Para a coleta de saliva, os camundongos foram anestesiados e receberam pilocarpina via intraperitoneal (0,5 mg/kg peso corporal). O fluido foi coletado com auxílio de algodão na cavidade bucal dos animais por 40 minutos. Os autores sugerem que os níveis salivares de corticosterona refletem os níveis plasmáticos desse marcador sendo, por isso, um biomarcador útil e menos invasivo para avaliação de estresse físico nos camundongos.

Lasisi e colaboradores (2017) trabalharam com ratos Wistar machos com peso inicial de 225 a 286 gramas, mas sem informações sobre idade. Avaliaram os efeitos da privação de sono sobre alguns parâmetros salivares e o nível de corticosterona nesse fluido. O nível de corticosterona na saliva desses animais ($n = 6$) foi de $3,31 \pm 0,98$ ng/mL. Considerando que, nessa dissertação, os animais de 60 e 90 dias apresentaram peso próximo à faixa apresentada pelos animais utilizados por Lasisi e colaboradores (2017), sugerimos que os dados de corticosterona salivar também poderiam ser relacionados ao encontrado nessa dissertação para os animais de 60 e 90 dias. Entretanto, os dados referentes tanto aos animais de 60 quanto de 90 dias, apresentam valores bem menores do que o encontrado por Lasisi e colaboradores (2017).

Uarquin e colaboradores (2016) utilizaram ratos wistar machos com 38 e 65 dias de idade. Avaliaram os níveis de corticosterona no plasma e no cabelo dos animais sob condições de superlotação. Animais de 38 dias ($n = 9$) apresentaram corticosterona plasmática = 316,22 ng/mL, concentração maior do que a apresentada nos dados dessa dissertação na idade próxima de 35 dias. Já os animais com 65 dias apresentaram corticosterona plasmática = 232,6 ng/mL, resultado similar ao encontrado nessa dissertação para os animais de 60 dias.

Shen e colaboradores (2017) utilizaram ratos Sprague-Dawley machos com idade entre 8 e 10 semanas. Avaliaram os efeitos de dois tipos de treinamento físico combinado com dieta rica em gordura ou dieta controle, tanto em fenótipos metabólicos quanto no nível de corticosterona desses animais. Nesse grupo ($n = 11$), a corticosterona plasmática foi de $40,84 \pm 2,13$ ng/mL. Esse resultado não se assemelha com os dados relativos aos animais de 60 e 90 dias dessa dissertação.

A corticosterona é um hormônio influenciado pelo ritmo circadiano. Dessa forma, o horário da coleta do fluido a ser analisado tem influência direta na dosagem desse hormônio. A comparação entre os resultados disponibilizados na literatura e o dessa dissertação poderiam não ter relação, caso a coleta tenha sido feita em horários distintos.

CONCLUSÕES

Nesse trabalho, conseguimos desenvolver um protocolo para a coleta de saliva em ratos Wistar em 3 diferentes idades: 35 dias, puberdade; 60 dias, adulto jovem no início da maturação sexual; 90 dias, adulto maduro. O protocolo estabelecido foi minimamente invasivo e proporcionou coleta de volume de amostra suficiente para análises bioquímicas de marcadores antioxidante e de estresse. Em humanos, a utilização do fluido salivar em substituição do sangue já é uma realidade, entretanto, em modelo animal não há muitos estudos na literatura. Nesta dissertação, pela primeira vez, demonstrou-se a presença de ácido úrico na saliva de ratos.

Dos 3 marcadores estudados, observou-se correlação apenas entre corticosterona e ácido úrico salivar nos animais adultos. Dessa forma, são necessários novos trabalhos com outros marcadores para avaliação do reflexo de substâncias sistêmicas na saliva dos ratos. E, assim, permitir que, junto ao uso do plasma, o uso do fluido salivar seja possível, garantindo que o mesmo animal possa ser acompanhado por toda sua vida, bem como a análise das alterações fisiológicas e bioquímicas em diferentes etapas do seu desenvolvimento.

PERSPECTIVAS

Investigar o perfil salivar de marcadores de estresse oxidativo e hormônios, não somente em animais saudáveis e eutróficos, mas em modelos experimentais de obesidade, diabetes, hipotireoidismo, estresse e programação metabólica. Além da comparação com amostras de plasma, aspectos como desenvolvimento ontogenético e dimorfismo sexual também serão estudados.

REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ-LARIO, B.; MACARRÓN-VICENTE, J. Uric acid and evolution. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 49, n. 11, p. 2010–2015, 2010.
- AMANO, O. *et al.* Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: - overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 45, n. 5, p. 241–250, 2012.
- ANNA, Z. *et al.* N-acetylcysteine supplementation did not reverse mitochondrial oxidative stress, apoptosis, and inflammation in the salivary glands of hyperglycemic rats. **Nutrition & diabetes**, v. 11, n. 1, p. 35, 2021.
- ANDREAZZI, A. E. *et al.* Review of the salivary dosage of insulin, testosterone and cortisol. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 30, 2020.
- ARANA, C. *et al.* Increased salivary oxidative stress parameters in patients with type 2 diabetes: Relation with periodontal disease. **Endocrinología Diabetes y Nutrición (English ed)**, v. 64, n. 5, p. 258–264, 2017.
- BANERJEE, S. *et al.* Fat accretion and the regulation of insulin-mediated glycogen synthesis after puberty in rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 273, n. 4, p. R1534–R1539, 1997.
- BARBOSA JÚNIOR, S. A.; BAPTISTA, R. I. A. DE A.; BARBOSA, C. N. Fisiologia comparada do fluido oral e suas principais aplicações clínicas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 18, n. 4, 2016.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BENARDE, M. A. *et al.* A method for the collection of large quantities of rat saliva. **Journal of dental research**, v. 35, n. 2, p. 326–327, 1956.
- BERNARDI, R. *et al.* Effect of pilocarpine mouthwash on salivary flow. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 105–110, 2002.
- BROWN, L. J. *et al.* Lethal hypoglycemic ketosis and glyceroluria in mice lacking both the mitochondrial and the cytosolic glycerol phosphate dehydrogenases. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 36, p. 32899–32904, 2002.
- CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. DE O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **PubVet**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2018.
- CARPENTER, G. H. The secretion, components, and properties of saliva. **Annual review of food science and technology**, v. 4, n. 1, p. 267–276, 2013.
- CARVALHO, L. A. C. *et al.* Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2. **The journal of biological chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8705–8715, 2017.

CATALÁN, V.; FRÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J. Inflammatory and oxidative stress markers in skeletal muscle of obese subjects. Em: **Obesity**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 163–189.

CERÓN, J. J. *et al.* Basics for the potential use of saliva to evaluate stress, inflammation, immune system, and redox homeostasis in pigs. **BMC veterinary research**, v. 18, n. 1, p. 81, 2022.

CHEYNE, V. D. A description of the salivary glands of the rat and a procedure for their extirpation 1,2. **Journal of dental research**, v. 18, n. 5, p. 457–468, 1939.

CLEMENTS, A. D. Salivary cortisol measurement in developmental research: where do we go from here? **Developmental psychobiology**, v. 55, n. 3, p. 205–220, 2013.

COSTA, L. F. **Estudo da atividade salivar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)**. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p. 77. 2009.

DAWES, C. *et al.* The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 6, p. 863–874, 2015.

DE MELLO AIRES, M. **Fisiologia**. 5. Ed. Guanabara Koogan, 2018.

DE OLIVEIRA, E. P.; BURINI, R. C. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 4, n. 1, p. 12, 2012.

DEEPA, T.; THIRRUNAVUKKARASU, N. Saliva as a potential diagnostic tool. **Indian journal of medical sciences**, v. 64, n. 7, p. 293–306, 2010.

DERİNDAĞ, G. *et al.* Evaluation of saliva glutathione, glutathione peroxidase, and malondialdehyde levels in head-neck radiotherapy patients. **Turkish journal of medical sciences**, v. 51, n. 2, p. 644–649, 2021.

EL RIDI, R.; TALLIMA, H. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. **Journal of advanced research**, v. 8, n. 5, p. 487–493, 2017.

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 20, p. 93–102, 2011.

FABBRINI, E. *et al.* Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. **Diabetes**, v. 63, n. 3, p. 976–981, 2014.

FALCÃO, D. P. *et al.* Sialometria: Aspectos de interesse clínico. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 53, n. 6, p. 525–531, 2013.

FALKOWSKI, M. *et al.* Whey protein concentrate WPC-80 improves antioxidant defense systems in the salivary glands of 14-month wistar rats. **Nutrients**, v. 10, n. 6, p. 782, 2018.

FANG, P. *et al.* A double-edged sword: Uric acid and neurological disorders. **Brain disorders & therapy**, v. 2, n. 2, p. 109, 2013.

FEMIANO, F. *et al.* A comparison of salivary substitutes versus a natural sialogogue (citric acid) in patients complaining of dry mouth as an adverse drug reaction: a clinical, randomized controlled study. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 112, n. 1, p. e15-20, 2011.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, 1997.

GE, T. *et al.* The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, 2020.

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

GYURÁSZOVÁ, M. *et al.* Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. **Physiological research**, v. 67, n. 6, p. 921–934, 2018.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HELLEKANT, G.; KASAHARA, Y. Secretory fibres in the trigeminal part of the lingual nerve to the mandibular salivary gland of the rat. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 89, n. 2, p. 198–207, 1973.

HRISTOV, B. D. The role of glutathione metabolism in chronic illness development and its potential use as a novel therapeutic target. **Cureus**, v. 14, n. 9, p. e29696, 2022.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The journal of prosthetic dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162–169, 2001.

KLIMIUK, A. *et al.* Salivary oxidative stress increases with the progression of chronic heart failure. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 3, p. 769, 2020.

KOŁODZIEJ, U. *et al.* Chronic high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats. **Archives of oral biology**, v. 84, p. 6–12, 2017.

KRISHNAMURTHY, P.; WADHWANI, A. Antioxidant enzymes and human health. Em: **Antioxidant Enzyme**. [s.l.] InTech, 2012.

LASISI, D. T. J. *et al.* Differential effects of total and partial sleep deprivation on salivary factors in Wistar rats. **Archives of oral biology**, v. 73, p. 100–104, 2017.

- LEWIS, J. G. Steroid analysis in saliva: an overview. **The Clinical biochemist. Reviews**, v. 27, n. 3, p. 139–146, 2006.
- LI, X. *et al.* Urate transporter URAT1 in hyperuricemia: New insights from hyperuricemic models. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 49, n. 6, p. 756–762, 2019.
- LIMA, L. A. DE O. *et al.* Effects of fluoride on submandibular glands of mice: Changes in oxidative biochemistry, proteomic profile, and genotoxicity. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 715394, 2021.
- LØVÅS, K.; HUSEBYE, E. S. Salivary cortisol in adrenal diseases. **Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny række**, v. 127, n. 6, p. 730–732, 2007.
- MACIEJCZYK, M. *et al.* Eight-week consumption of high-sucrose diet has a pro-oxidant effect and alters the function of the salivary glands of rats. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1530, 2018.
- MACIEJCZYK, M. *et al.* Antioxidant defense, oxidative modification, and salivary gland function in an early phase of cerulein pancreatitis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 8403578, 2019.
- MACIEJCZYK, M. *et al.* Salivary redox biomarkers in insulin resistance: Preclinical studies in an animal model. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, p. 3734252, 2021.
- MIJAILOVIC, N. R.; VESIC, K.; BOROVCANIN, M. M. The influence of serum uric acid on the brain and cognitive dysfunction. **Frontiers in psychiatry**, v. 13, p. 828476, 2022.
- MAIUOLO, J. *et al.* Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International journal of cardiology**, v. 213, p. 8–14, 2016.
- MALAMUD, D. Saliva as a diagnostic fluid. **Dental clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159–178, 2011.
- MARSH, P. D. *et al.* Influence of saliva on the oral microbiota. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 80–92, 2016.
- MARTIN, L. E. *et al.* Salivary proteins alter taste-guided behaviors and taste nerve signaling in rat. **Physiology & behavior**, v. 184, p. 150–161, 2018.
- MARUYAMA, C. L. *et al.* Comparing human and mouse salivary glands: A practice guide for salivary researchers. **Oral diseases**, v. 25, n. 2, p. 403–415, 2019.
- MATSUZAKI, K. *et al.* Daily voluntary exercise enhances pilocarpine-induced saliva secretion and aquaporin 1 expression in rat submandibular glands. **FEBS open bio**, v. 8, n. 1, p. 85–93, 2018.
- MELMED, S. *et al.* **Williams textbook of endocrinology**. 13. ed. Filadélfia, PA, USA: Elsevier - Health Sciences Division, 2016.

MENDES, A. P. A.; PEREIRA, R. C.; DE ANGELIS-PEREIRA, M. C. Estresse oxidativo e sistemas antioxidantes: Conceitos fundamentais sob os aspectos da Nutrição e da Ciência dos alimentos. Em: **Tecnologia de Alimentos: Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos - Volume 2**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2020. p. 296–312.

MORAES, C. D.; SAMPAIO, R. C. Estresse oxidativo e envelhecimento: papel do exercício físico. **Motriz: revista de educacao fisica. UNESP**, v. 16, n. 2, 2010.

NGAMCHUEA, K. *et al.* Salivary glutathione in bipolar disorder: A pilot study. **Journal of affective disorders**, v. 238, p. 277–280, 2018.

NERY, R. A. *et al.* Uric acid and tissue repair. **Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva [Brazilian archives of digestive surgery]**, v. 28, n. 4, p. 290–292, 2015.

NOHARA, M. *et al.* Evaluation of response to restraint stress by salivary corticosterone levels in adult male mice. **The Journal of veterinary medical science**, v. 78, n. 5, p. 775–780, 2016.

ONOPIUK, B. *et al.* Effect of metronidazole on the oxidoreductive processes in the submandibular and parotid glands in experimental research. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 7083486, 2018.

ONOPIUK, B. M. *et al.* The beneficial impact of the black chokeberry extract against the oxidative stress in the sublingual salivary gland of rats intoxicated with cadmium. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, p. 6622245, 2021.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. DE C. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. [s.l.] Editora Blucher, 2016.

OSÓRIO, N. M. *et al.* Saliva e saúde oral. **Revista Portuguesa de Estoma**, v. 41, n. 4, p. 195–198, 2000.

OZTÜRK, L. K. *et al.* Association between dental-oral health in young adults and salivary glutathione, lipid peroxidation and sialic acid levels and carbonic anhydrase activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 11, p. 956–959, 2008.

PFAFFE, T. *et al.* Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. **Clinical chemistry**, v. 57, n. 5, p. 675–687, 2011.

PIZZINO, G. *et al.* Oxidative stress: Harms and benefits for human health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

REED, M. C. *et al.* A mathematical model of glutathione metabolism. **Theoretical biology & medical modelling**, v. 5, n. 1, p. 8, 2008.

RIIS, J. L. *et al.* The validity, stability, and utility of measuring uric acid in saliva. **Biomarkers in medicine**, v. 12, n. 6, p. 583–596, 2018.

ROMERO, A. C. *et al.* Salivary alterations in rats with experimental chronic kidney disease. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0148742, 2016.

ROMERO, A. C.; IBUKI, F. K.; NOGUEIRA, F. N. Sialic acid reduction in the saliva of streptozotocin induced diabetic rats. **Archives of oral biology**, v. 57, n. 9, p. 1189–1193, 2012.

ROMERO, M. DEL M. *et al.* Modulation in Wistar rats of blood corticosterone compartmentation by sex and a cafeteria diet. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57342, 2013.

SAUTIN, Y. Y.; JOHNSON, R. J. Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. **Nucleosides, nucleotides & nucleic acids**, v. 27, n. 6, p. 608–619, 2008.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in physiology**, v. 11, p. 694, 2020.

SHEN, Y. *et al.* Effects of high-intensity interval versus mild-intensity endurance training on metabolic phenotype and corticosterone response in rats fed a high-fat or control diet. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0181684, 2017.

SHIBASAKI, K. *et al.* Uric acid concentration in saliva and its changes with the patients receiving treatment for hyperuricemia. **Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society**, v. 8, n. 3, p. 484–491, 2012.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciencia e cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.

SOUKUP, M. *et al.* Salivary uric acid as a noninvasive biomarker of metabolic syndrome. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 4, n. 1, p. 14, 2012.

SPIGA, R. *et al.* Uric acid is associated with inflammatory biomarkers and induces inflammation via activating the NF- κ B signaling pathway in HepG2 cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 6, p. 1241–1249, 2017.

STINCONE, A. *et al.* The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 90, n. 3, p. 927–963, 2015.

SUCKOW, M. A.; WEISBROTH, S. H.; FRANKLIN, C. L. (EDS.). **The Laboratory Rat**. 2. ed. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2006.

SUN, H.-L. *et al.* Function of uric acid transporters and their inhibitors in hyperuricaemia. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 667753, 2021.

TORREGROSSA, A.-M. *et al.* Induction of salivary proteins modifies measures of both orosensory and postingestive feedback during exposure to a tannic acid diet. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e105232, 2014.

UARQUIN, D. G. *et al.* Effect of overcrowding on hair corticosterone concentrations in juvenile male Wistar rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 55, n. 6, p. 749–755, 2016.

VERNEROVÁ, A. *et al.* Non-invasive determination of uric acid in human saliva in the diagnosis of serious disorders. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 59, n. 5, p. 797–812, 2021.

VISSINK, A. *et al.* An adaptation of the Lashley cup for use in rat saliva collection. **Archives of oral biology**, v. 34, n. 7, p. 577–578, 1989.

WU, G. *et al.* Glutathione metabolism and its implications for health. **The journal of nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489–492, 2004.

ZALEWSKA, A. *et al.* NAC supplementation of hyperglycemic rats prevents the development of insulin resistance and improves antioxidant status but only alleviates general and salivary gland oxidative stress. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, p. 8831855, 2020.

ŻUKOWSKI, P. *et al.* Effect of N-acetylcysteine on antioxidant defense, oxidative modification, and salivary gland function in a rat model of insulin resistance. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 1–11, 2018.

ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "**ACOMPANHAMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO ÚRICO PLASMÁTICO E SALIVAR EM MODELO ANIMAL DE PROGRAMAÇÃO METABÓLICA**", registrada com o nº 007/2020, sob a responsabilidade de **Gustavo Casimiro Lopes** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 24/11/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	24/11/2024
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	50
Peso/Idade	até 600 gramas / até 150 dias
Sexo	Macho e Fêmea
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 24 de Novembro de 2020.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ