

**Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**  
**Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP**  
**“Dr. Antônio Guilherme de Souza”**  
**Instituto Butantan**

**Aline Vasconcelos Silva**

**Avaliação da expressão imuno-histoquímica de NGF e TrkA durante o  
envelhecimento de glândulas salivares sublinguais humanas**

**São Paulo**  
**2020**

**Aline Vasconcelos Silva**

**Avaliação da expressão imuno-histoquímica de NGF e TrkA durante o envelhecimento de glândulas salivares sublinguais humanas**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Butantan, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista Biotecnologia em Saúde – Vacinas e Biofármacos.

Orientador (a): Adriana da Costa Neves.

**São Paulo**

**2020**

### Dados internacionais de catalogação na publicação

Silva, Aline Vasconcelos

Avaliação da expressão imuno-histoquímica de NGF e TrkA durante o envelhecimento de glândulas salivares sublinguais humanas. / Aline Vasconcelos Silva; orientadora Adriana da Costa Neves. – São Paulo, 2020.

33 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza” desenvolvido no Instituto Butantan para o Curso de Especialização em Biotecnologia em Saúde – Vacinas e Biofármacos.

1. Glândulas salivares. 2. Fatores de crescimento 3. Biotecnologia. I. Silva, Aline Vasconcelos. II. Instituto Butantan. III. Curso de Especialização em Biotecnologia em Saúde – Vacinas e Biofármacos. IV. Avaliação da expressão imuno-histoquímica de NGF e TrkA durante o envelhecimento de glândulas salivares sublinguais humanas.

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno a partir do modelo desenvolvido pela

Biblioteca do Instituto Butantan.

#### AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Aline Vasconcelos Silva, aluno (a) do curso de especialização em Biotecnologia em Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

Imediato

06 meses

12 meses

Outro prazo \_\_\_\_\_ Justifique:

São Paulo, 27 de fevereiro de 2020.

.....*Aline Vasconcelos Silva*.....

aluno(a): Aline Vasconcelos Silva.

De acordo:.....*Adriana Costa*.....

Orientador(a): Adriana da Costa Neves.

## RESUMO

SILVA, Aline Vasconcelos. **Avaliação da expressão imuno-histoquímica de NGF e TrkA durante o envelhecimento de glândulas salivares sublinguais humanas.** 2020. 33 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia em Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

A saliva desempenha um papel importante na deglutição, mastigação e fala, e é essencial para manter a saúde bucal adequada. O processo de envelhecimento diminui a produção de saliva, causando uma condição chamada xerostomia, que é um grande problema para os idosos. A literatura mostra que durante o envelhecimento, o parênquima das glândulas salivares é substituído por gordura e tecido conjuntivo. O fator de crescimento neural (NGF) e o receptor para NGF (TrkA) são sintetizados e secretados pelas glândulas salivares (GS); no entanto, o papel fisiológico dessas proteínas na saliva e na manutenção das GS não foi totalmente elucidado. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações na expressão de NGF e TrkA na GS sublingual (SL) durante o processo de envelhecimento. Os casos foram divididos em dois grupos para comparação: grupo de adultos, indivíduos entre 30 e 60 anos; e grupo de idosos, indivíduos acima de 60 anos. A expressão de NGF e TrkA foi avaliada por imunoistoquímica. A análise quantitativa foi mensurada pelo software Image J, pelo teste de Mann Whitney e pelo teste de correlação de Pearson. Os dados qualitativos foram analisados pelo teste exato de Fisher. Analisando as amostras de SL, observamos que a expressão de NGF ocorreu principalmente nas células serosas, nas células mucosas e nos ductos. A expressão de NGF nos ácinos serosos foi difusa, granular e citoplasmática. Nos ductos estriado e excretor, o NGF foi bastante expresso no citoplasma e apresentava um padrão mais difuso do que granular. A expressão de NGF nas células da mucosa foi menor quando comparada com as células serosas e ductais e predominantemente no citoplasma, o padrão de coloração foi difuso e granular. O teste exato de Fisher mostrou que houve maior número de casos marcados, no citoplasma dos ductos excretor e estriado, no grupo adulto em comparação com o idoso ( $p=0,037$ ). Além disso, a expressão granular foi maior nas células do ducto estriado de adultos em comparação com os idosos ( $p=0,043$ ). O teste de Mann Whitney demonstrou que

não houve diferença na expressão de NGF no grupo adulto comparado ao grupo idoso ( $p \geq 0,05$ ) e o teste de Correlação de Pearson, mostrou que não houve correlação linear entre a idade dos indivíduos e a expressão do NGF. A expressão de TrkA foi mais expressiva nos ácinos mucosos e nos ductos. Nas células mucosas, o TrkA foi expresso no citoplasma e na porção peribasal de forma difusa e granular. Nas células ductais, o TrkA foi expresso em quase todos os casos e o padrão foi citoplasmático e granular. Nos ácinos serosos, a marcação foi predominantemente citoplasmática e difusa. O teste exato de Fisher mostrou que a marcação granular das células do ducto estriado era maior no grupo de idosos do que no grupo de adultos ( $p = 0,033$ ). Por outro lado, o padrão difuso foi maior nas células do ducto estriado dos adultos se comparado aos idosos ( $p = 0,008$ ). O teste de Mann Whitney demonstrou que não houve diferença na expressão de TrkA no grupo adulto comparado ao grupo idoso ( $p \geq 0,05$ ) e o teste de Correlação de Pearson, mostrou que não houve correlação linear entre a idade dos indivíduos e a expressão do TrkA.

**Palavras-chave:** Glândula salivar. Fatores de crescimento. NGF, TrkA, imunohistoquímica.

## ABSTRACT

SILVA, Aline Vasconcelos. **Evaluation of immunohistochemical expression of NGF and TrkA during the aging of human sublingual salivary glands.** 2020. 33 p. Monograph (Specialization in Health Biotechnology - Vaccines and Biopharmaceuticals) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; Instituto Butantan, São Paulo, 2020.

Saliva plays an important role in swallowing, chewing and speaking, and is essential for maintaining proper oral health. The aging process leaves to decrease of saliva production causing a condition called xerostomia, which is a big problem for the elderly. Literature shows that during aging the parenchyma of the salivary glands is replaced by fat and connective tissue. Neural growth factor (NGF) and NGF receptor (TrkA) are synthesized and secreted by salivary glands (SG); however, the physiological role of these proteins in saliva and maintenance of SG has not been fully elucidated. The aim of this study was evaluate alterations in NGF and TrkA expression in sublingual SG (SL) during the aging process. The cases were divided into two groups for comparison: adult group, individuals between 30 and 60 years old; and elderly group, individuals over 60 years. NGF and TrkA expression were evaluated by immunohistochemistry. Quantitative analysis was measured by Image J software, Mann Whitney's Test and Pearson's Correlation Test. Qualitative data were analyzed by Fisher's Exact Test. Analyzing the SL samples, we observed that NGF expression occurred in serous, mucous and ducts cells. The NGF expression in serous acini was diffuse, granular and cytoplasmatic. In both striated and excretory ducts, NGF was quite expressed in the cytoplasm and had a more diffuse than granular pattern. The NGF expression in mucosal cells was smaller and was predominantly in the cytoplasm, the staining pattern was both diffuse and granular. Fisher's Exact Test showed that there was higher labeling in striatal and excretory duct cell cytoplasm in the adult group compared to the elderly one ( $p=0,037$ ). In addition, the granular expression was higher in the striatal duct cells of adults compared to the elderly ( $p=0,043$ ). Mann Whitney's test demonstrated that there was no difference in NGF expression in the adult group compared to the elderly one ( $p\geq 0.05$ ). Pearson's correlation test did not show linear correlation between age and expression of NGF. The TrkA expression was more expressive in mucosal acini and ducts. In mucous cells, TrkA was expressed in the cytoplasm and in peribasal portion

diffusely and granularly. In ductal cells, TrkA was expressed in almost all cases and the pattern was cytoplasmatic and granular. In serous acini, the labeling was predominant cytoplasmatic and diffuse. Fisher's Exact Test showed that the granular labeling of striated duct cells was higher in the elderly group than in the adult one ( $p=0,033$ ). In contrast, the diffuse pattern was higher in striated duct cell of the adults if compared with the elderly ( $p=0,008$ ). Mann Whitney's test demonstrated that there was no difference in TrkA expression in the adult group compared to the elderly one ( $p\geq 0.05$ ). Pearson's correlation test did not show linear correlation between age and expression of TrkA.

**Keywords:** salivary gland, growth factor, NGF, TrkA, immunohistochemistry.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da glândula salivar mostrando os tipos celulares.....	14
Figura 2. Expressão imunistoquímica do NGF na glândula SL. ....	23
Figura 3. Diagrama de Dispersão da expressão do NGF nas GSL pela idade dos indivíduos. ....	24
Figura 4. Diagrama de Correlação Linear de Pearson da expressão do NGF nas GSL pela idade dos indivíduos.....	24
Figura 5. Expressão imunistoquímica do TrkA na glândula SL. ....	26
Figura 6. Diagrama de Dispersão da expressão do TrkA nas GSL pela idade dos indivíduos. ....	27
Figura 7. Diagrama de Correlação Linear de Pearson da expressão do TrkA nas GSL pela idade dos indivíduos.....	27
Figura 8. Diagrama da média de expressão do NGF e TrkA nas GSL .....	28

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1 Glândulas salivares:</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 Alterações das glândulas salivares</b> .....	<b>15</b>
1.2.1 Xerostomia: .....	15
<b>1.3 Fatores de crescimento</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3. MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1 Coleta das Amostras</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2 Processamento das amostras e microtomia</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Imunoistoquímica</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Análise Qualitativa</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 Análise Quantitativa</b> .....	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1 Análise da expressão imunoistoquímica</b> .....	<b>22</b>
4.1.1 NGF.....	22
4.1.2 TrkA.....	25
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>39</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A saliva tem um papel abrangente na manutenção da saúde, conforto e bem-estar do organismo humano (SREEBNY, 2011). A saliva desempenha um papel importante na deglutição, mastigação e fala, sendo essencial para a manutenção da saúde oral adequada. As atividades adicionais salivares incluem efeito anti-cárie e antifúngico, proteção física e imunológica para a mucosa oral e gastrointestinal. Devido à essas importantes funções, alterações qualitativas ou quantitativas da saliva podem causar prejuízo das funções orais e secura da mucosa oral, trazendo desconforto, gengivite, cárie dentária e infecção fúngica, afetando a qualidade de vida do paciente (NAGLER, 2004).

A saliva é um fluido aquoso encontrado na cavidade oral, composto por uma mistura complexa de produtos secretórios orgânicos e inorgânicos (LIMA *et al.*, 2010).

A saliva humana é composta de 98% de água e os 2% restantes consistem de outros compostos, tais como os eletrólitos, lubrificantes (mucinas e proteínas ricas em prolina), compostos antimicrobianos (Imunoglobulina secretória A, aglutinina, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidase salivar, cistatina, histatina, estaterina), várias enzimas (amilase, lipase, ribonuclease, protease) e fatores de crescimento [Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), Fatores de Crescimento Transformador (TGF)- $\alpha$  e  $\beta$ , Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fatores de Crescimento insulina-like (IGF) I e II e Fator de Crescimento Neural (NGF)]. Os componentes salivares facilitam a mastigação, a fala e a deglutição, e iniciam o processo de digestão de certos tipos de alimentos por várias enzimas. Além disso, protegem a mucosa oral e os dentes, e limpam as superfícies. Deste modo, qualquer condição que afete a composição e o volume de saliva secretada pode ter um impacto negativo sobre a região orofaríngea. Ainda, é conhecida como “fonte da vida” devido ao seu bem conhecido efeito cicatrizante de feridas. Esta atividade decorre principalmente ao fato de as glândulas salivares produzirem e secretarem uma quantidade extremamente elevada de EGF na cavidade oral, exibindo efeito citoprotetor e proliferativo, não apenas para a mucosa oral, como também para o esôfago e parte baixa do trato gastrointestinal. Em pequenas quantidades, outros

fatores de crescimento, tais como TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGF, IGF-I, IGF-II e NGF, também são relatados em várias concentrações na saliva (VARGA, 2012).

As proteínas salivares, hormônios, imunoglobulinas e proteínas antimicrobianas são marcadores biológicos. A saliva apresenta quantidades significativas de proteínas e ácidos nucleicos, que refletem o estado fisiológico do indivíduo e, por ser de fácil acesso para coleta e análises, auxiliam no diagnóstico de doenças (VUKOSAVLJEVIC, CUSTODIO, SIQUEIRA, 2011; LEE, H.Y.; WONG, T.D, 2009).

Estudos tem sido controversos, alguns demonstraram que morfologicamente há mudanças no parênquima das glândulas salivares com o aumento da idade em indivíduos normais, havendo uma diminuição na quantidade de ácinos, células secretoras de saliva, que são substituídas por tecido adiposo e fibrosos (VISSINK, SPIJKERVET & AMERONGEN; VEERMAN *et al.*, 1996). Existem outros estudos que mostram que a função das glândulas continua intacta em indivíduos idosos saudáveis, sem o uso de medicamentos. Dessa forma, ainda é controverso na literatura se a diminuição do fluxo salivar está relacionada ao envelhecimento do indivíduo por si só ou se está relacionada à presença de doenças de base e ao uso maior de terapia medicamentosa (BEN-ARYEH *et al.*, 1984).

O primeiro indício de que as glândulas salivares sofrem sim alterações com o passar da idade, independentemente do fato de haver ou não consumo de medicação é que existe uma substituição do parênquima glandular funcional por um tecido adiposo e fibroso não funcional, que vem acompanhado por uma redução na produção e na composição da saliva. (SCOTT, 1986; VISSINK, SPIJKERVET & AMERONGEN; VEERMAN *et al.*, 1996).

### **1.1 Glândulas salivares**

As glândulas salivares podem ser divididas em glândulas parótidas, submandibular, sublingual e salivares menores (LOO *et al.*, 2010, KAUFMAN & LAMSTER, 2002). Podem ser mucosas ou serosas, de acordo com a quantidade de mucinas ou proteínas que produzem. A secreção mucosa é mais produzida pelas parótidas e a serosa pelas submandibulares e sublinguais (STRONG, 2006).

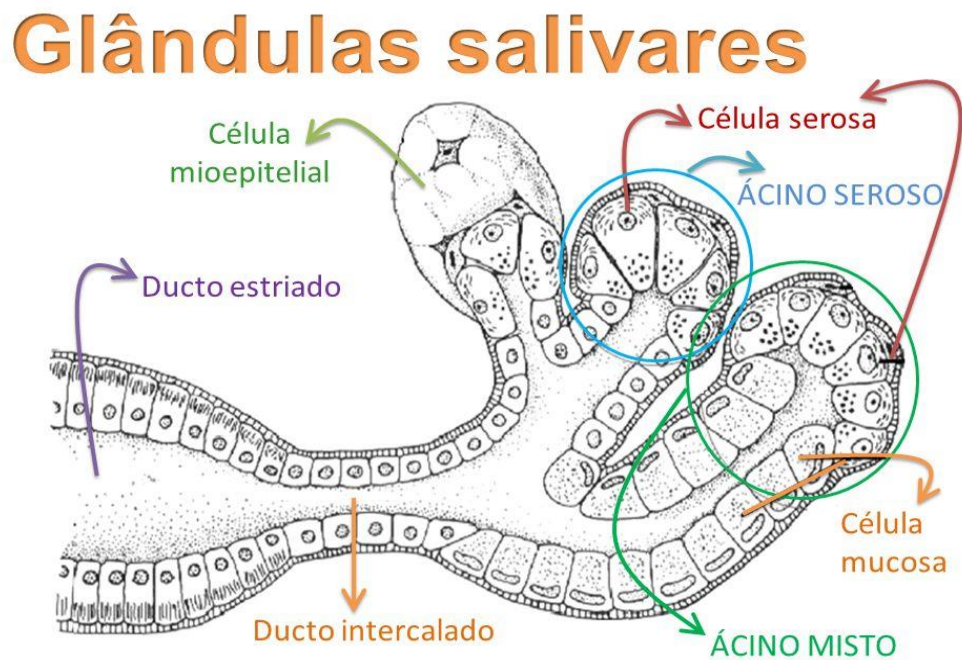
As glândulas salivares consistem em uma série de ductos ramificados, aca-

bando na porção secretora terminal, conhecida como ácino, de formato esférico ou tubular. O ducto excretor principal, que desemboca dentro da cavidade oral, divide-se progressivamente em ductos excretores menores interlobulares, que adentram nos lóbulos das glândulas. O componente predominante do ducto interlobular é o ducto estriado, que determina maior modificação da saliva primária (NANCI, 2008; VARGA, 2012).

A saliva é liberada das células acinares direto para o lúmen dos ductos que se ligam até a liberação na mucosa oral. Os ductos são denominados como intercalar, estriado e excretor (JAEGER; FREITAS, 2016).

As células acinares são amplamente divididas em dois tipos: células serosas e mucosas (VEERMAN *et al.*, 1996). As células serosas possuem formato piramidal com a porção basal junto ao estroma e seu ápice em direção ao lúmen. Nessas células são secretadas íons, água, proteínas e glicoproteínas que tem atividade enzimática e antimicrobiana. As células mucosas possuem formatos tubulares e são maiores que as células serosas e liberam mucinas e glico-conjugados. Em associação pode haver semi-luas serosas conectadas com as células mucosas. Estudos têm revelado que a composição química e os padrões morfológicos dos grânulos secretórios são muito diferentes quando comparamos as células serosas com as células mucosas (AMANO *et al.*, 2012).

**Figura 1.** Representação da glândula salivar mostrando os tipos celulares.



**Fonte:** Histology Text Atlas Book. 2019. Disponível em: <<https://www.visualhistology.com/uncategorized/chapter-12-the-oral-cavity/>>. Acesso em: 24 set. 2019.

Os ductos intercalados estão em continuidade com a unidade secretora terminal. Eles conectam as unidades secretoras terminais ao ducto estriado. A luz ou lúmen da unidade secretora terminal é contínua com a do ducto intercalado. Ao microscópio de luz, o ducto intercalado é formado por uma camada de células cubóides que apresentam núcleo central e citoplasma escasso. Em razão do pequeno tamanho e da ausência de características específicas, os ductos intercalados são de difícil identificação em cortes histológicos (JAEGER; FREITAS, 2016).

Os ductos estriados são compostos por epitélio colunar simples, além de conduzir a saliva tem como função secretar e reabsorver eletrólitos e água do lúmen. Além disso, estudos ultra-estruturais, de células do ducto estriado tem demonstrado a presença de grande quantidade de vesículas pequenas claras na porção apical do citoplasma. Essas vesículas expressam marcadores histoquímicos para endocitose e transcitose (BARKA, 1980).

Os ductos excretores são a porção final das glândulas salivares e transportam a saliva para a cavidade oral. Sua estrutura é composta por epitélio pseudo-

estratificado colunar com presença rara de células caliciformes (MARTINEZ-MADRIGAL, MICHEAU, 1989).

As células mioepiteliais são contrácteis, associadas à unidade secretora terminal e aos ductos intercalados das glândulas salivares. São células que possuem característica contráctil das células musculares lisas, mas são de origem epitelial. As células mioepiteliais estão localizadas entre a lâmina basal e a membrana das células secretoras ou ductais. São unidas a essas células por desmossomos. A contração das células mioepiteliais promove suporte das unidades secretoras terminais durante a secreção da saliva. Além disso, estão envolvidas na expulsão da saliva das células secretoras em direção ao sistema de ductos (JAEGER; FREITAS, 2016).

## **1.2 Alterações das glândulas salivares**

### **1.2.1 Xerostomia**

A xerostomia é a sensação subjetiva de boca seca, um sintoma que pode ou não ser acompanhado de hipossalivação, uma diminuição do fluxo salivar (NAPÉÑAS; BRENNAN; FOX, 2009).

A xerostomia, conhecida também como assialorréia, *secura da boca* ou *boca seca*, é uma manifestação clínica da disfunção das glândulas salivares, decorrente da idade avançada. Fox *et al.* (1985) e Feio & Sapeta (2005) definem xerostomia como uma sensação subjetiva de boca seca, conseqüente ou não da diminuição da função das glândulas salivares, com alterações quer na quantidade, quer na qualidade da saliva.

Para Trombelli *et al.* (1992), Greenspan (1996), Nelson *et al.* (1998) e Papas *et al.* (1998) a diminuição da produção de saliva (xerostomia) também caracteriza sintomas de língua dolorosa, lisa, vermelha e atrófica; diminuição do paladar, desconforto oral, dor, mucosite, aumento de incidência de cáries e doença periodontal. Além disso, indivíduos com xerostomia apresentarem dificuldades no uso de próteses, halitose grave, síndrome da ardência bucal, fissuras e rachaduras na comissura labial, ulceração e dor; doenças fúngicas, problemas com a fala, diminuição do pH e tamponamento salivar.

Segundo Meyer *et al.* (1937), embora a xerostomia possa afetar pessoas de

várias idades, é mais provável que ocorra entre as pessoas idosas devido a vários fatores etiológicos, como alterações nas glândulas salivares decorrentes do envelhecimento.

A xerostomia também possui etiologia relacionada aos hábitos, como tabagismo e alcoolismo, além de uma ampla variedade de fármacos, os quais aumentam a suscetibilidade da condição (SREEBNY; SCHWARTZ, 1997). Cerca de 70% dos adultos que estão sendo submetidos a tratamentos farmacológicos podem desenvolver a xerostomia como efeito adverso (CIANCIO, 2004). Dentre estes, destacam-se os indivíduos que tomam antidepressivos tricíclicos, anticolinérgicos,  $\alpha$ - e  $\beta$ -bloqueadores, diuréticos, antipsicóticos, anti-histamínicos e anti-hipertensivos (SCULLY, 2003; MIRANDA-RIUS *et al.*, 2015).

A idade também é um fator importante na produção de saliva, sendo que nos idosos a produção de saliva é menor (STRONG, 2006).

### **1.3 Fatores de crescimento**

Os fatores tróficos ou de crescimento são moléculas, geralmente proteínas, produzidas por diferentes tipos celulares, que regulam a biologia celular tanto em tecidos embrionários, como adultos (MORIS; VEGA, 2003).

As neurotrofinas (NT) estão atualmente representadas pelo fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e dois tipos de neurotrofinas (NT) -3 e 4/5 (PEZET; MCMAHON, 2006).

As neurotrofinas exercem múltiplas ações já descritas em neurônios e em células efetadoras, possuindo afinidade por duas classes de receptores: os pertencentes à família tirosina-quinases (TrkA, TrkB e TrkC) e o receptor p75 da superfamília de receptores para fator de necrose tumoral (TNF) (SCULLY & OTTEN, 1995).

Estas NTs atuam sobre as células sensíveis por meio de dois tipos de receptores: os de alta afinidade, os Trks, e os de baixa afinidade, os p75. Os receptores Trks são glicoproteínas transmembrana com atividade tirosino-quinase intracitoplasmática (SHIBAYAMA; KOIZUMI, 1996).

Todas as neurotrofinas descritas ligam-se ao receptor p75, porém, com diferentes cinéticas de ligação e menor afinidade em relação aos receptores Trk (MCDONALD & CHAO, 1995; TERENCEHI, 1999; IBANES, 1998). Os receptores Trk



têm como característica a presença de domínios tirosino-quinases desencadeadores da transdução de sinais intracelulares. Sofrem dimerização induzida pelo ligante, ativando múltiplos sinais que promovem manutenção e sobrevivência neuronal através da auto-fosforilação de domínios específicos (BARBACID, 1995; GARGANO *et al.*, 1997; SCULLY & OTTEN, 1995).

TrkA se expressa em uma subpopulação de neurônios sensitivos (nociceptivos e termocéptivos) e simpáticos no sistema nervoso periférico (SNP), e nos neurônios colinérgicos da região basal do cérebro. Quanto ao receptor de baixa afinidade, o p75, este é capaz de se ligar a todas NTs com semelhante afinidade e tem uma distribuição muito ampla no sistema nervoso central (SNC) e no SNP (HOEHNER *et al.*, 1995). A família de neurotrofinas nem sempre apresenta apenas ação neuro-protetora. Por exemplo, a ativação de alguns receptores durante o desenvolvimento neuronal precoce bloqueia a apoptose e promove a sobrevivência e diferenciação celular. Já em neurônios adultos, caso o receptor p75 seja expresso na ausência de TrkA ou se a razão p75/TrkA for alta, podem promover apoptose (CHAO, 2003; BARDE, 2004).

Dentre as diferentes NT, o NGF é a mais estudada. Membro protótipo da família é constituído de 118 aminoácidos e possui peso molecular de 130 Kda. Sua molécula é composta de 3 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). A subunidade  $\beta$  é a responsável pela atividade biológica e a subunidade  $\gamma$  é uma protease responsável pela transformação do transcrito pró-NGF em sua forma ativa. A subunidade  $\alpha$  não apresenta função conhecida (revisão em SOFRONIEW *et al.*, 2001). Embora se conheça o papel trófico do TrkA, a função do p75 permanece controversa, havendo evidências de que ele possa atuar tanto na diferenciação, como na morte celular, dependendo do tecido que o expressa. Em alguns casos, o p75 causa apoptose, sempre em resposta ao NGF; entretanto em outros casos, atua como protetor da morte celular (DESCAMPS *et al.*, 2001).

O NGF atua sobre neurônios do sistema nervoso central e fibras simpáticas e sensoriais de fino calibre do sistema nervoso periférico (MORIS; VEGA, 2003). Entretanto, diversos tipos celulares são capazes de produzir NGF durante o desenvolvimento e na vida adulta. Dentre eles, podemos citar queratinócitos, melanócitos, células musculares lisas, fibroblastos, células de Schwann. Também ocorre síntese de NGF em órgãos como gônadas, tireóide, paratireóide e em

glândulas exócrinas como as glândulas salivares (revisão em SOFRONIEW *et al.*, 2001).

Um nível de NGF superior na saliva indica que a glândula salivar pode desempenhar um papel importante na síntese ou secreção de NGF. Muitos estudos demonstraram que as glândulas salivares são uma fonte importante de neuropeptídeos com variedade de atividades biológicas, tais como o fator de crescimento epidérmico, o fator de crescimento de transformação e o fator de crescimento semelhante à insulina, desempenhando um papel no controle neuroendócrino de homeostase em tecidos lesionados (HANSSON and TUNHALL, 1986; MILLER *et al.*, 1989; BERG *et al.*, 1990; AMANO *et al.*, 1993; PENSCHOW & COGHLAN, 1993; MATHISON, DAVISON & BEFUS, 1994; ZELLES *et al.*, 1995).

A diminuição no NGF do plasma e a baixa expressão de NGF em receptores periféricos de linfócitos nos idosos pode indicar alterações da atividade funcional dessas células (GÓMEZ-PINILLA, COTMAN & NIETO-SAMPEDRO, 1989; ANTONELLI, BRACCI-LAUDIERO & ALOE, 2003).

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo desse estudo foi avaliar alterações qualitativas e quantitativas no padrão de expressão imunoistoquímico do fator de crescimento NGF e seu respectivo receptor TrkA, na glândula salivar sublingual (SL) no processo de envelhecimento humano.

## **3.MÉTODOS**

### **3.1 Coleta das Amostras**

A coleta das amostras foi realizada no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital de São Paulo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos (CAAE:26517914 31001 5505). Foram coletadas glândulas SL de indivíduos do sexo masculino com idade entre 30 a 93 anos. Os casos foram divididos em dois grupos para a comparação:

- Grupo de indivíduos adultos: indivíduos entre 30 e 60 anos de idade;
- Grupo de indivíduos idosos: indivíduos com mais de 60 anos de idade.

### 3.2 Processamento das amostras e microtomia

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10%. Os espécimes foram desidratados em série de etanol em concentração crescente (70%, 80%, 95%, 100%) 1 hora em cada solução, diafanizados em dois banhos de xilol, de 1,5h cada e embebidos em parafina líquida em dois banhos de 1,5h cada, através do uso do processador automático de tecidos OMA DM-40 (OMA, São Paulo, Brasil). A inclusão foi feita em parafina líquida através do uso do dispensador de parafina da marca OMA, modelo IO-88 D (OMA, São Paulo, Brasil).

Selecionamos então um bloco de parafina de cada amostra para realizar os cortes histológicos. Os cortes histológicos foram realizados em um micrótomo manual do modelo Accu-cut® SRM™ (Sakura, Alphen aan den Rijn, Holanda) utilizando-se navalhas descartáveis. De cada bloco de parafina contendo o material de biópsia foram obtidos cortes seriados de 3µm. Os cortes utilizados para a realização das técnicas de imunistoquímica foram estendidos em lâminas de vidro pré-silanizadas da marca (Starfrost, Knittel Glaser, Bielefeld, Alemanha).

### 3.3 Imunoistoquímica

Realizamos reações imunoistoquímicas para os antígenos das seguintes proteínas: NGF e TrkA. Para a realização das reações os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol: o primeiro por 30 minutos, e o segundo por 20 minutos, os dois na temperatura ambiente. A seguir, foram reidratados em série descendente de etanóis, a partir de duas passagens em etanol absoluto, seguidos por duas passagens em etanol 95%, durante 2 minutos cada. Em seguida, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% durante 10 minutos, para retirada do pigmento formólico.

Após a lavagem em água destilada, as lâminas receberam tratamento de recuperação antigênica. Este procedimento tem por objetivo restabelecer os sítios antigênicos e romper as ligações cruzadas promovidas pelo formol. O tratamento utilizado para a padronização dos dois anticorpos citados acima foi o de tampão citrato 10mM em banho-maria a 95-100°C por 30min e 10min esfriando na temperatura ambiente.

Após o tratamento, os cortes foram novamente lavados em água destilada,

em três banhos de 5 minutos cada, e seguiram para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, para o qual foram realizados dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 6%. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em três banhos de 5 minutos cada com água destilada, e foram imersos uma vez em solução de TRIS (Tris- hidroximetil- aminometano) pH 7,4, por 5 minutos.

Tanto para o NGF como para o TrkA, as lâminas foram então submetidas à incubação com solução de BSA 1% (BSA a 1% diluído em TRIS-HCL pH 7,4 com 5% de Soro Fetal Bovino) por 30 min para bloqueio de reações inespecíficas. As lâminas então foram submetidas aos anticorpos primários, que também foram diluídos em solução de BSA a 1%. A diluição usada tanto para o anticorpo anti-NGF, quanto para o anticorpo anti-TrkA foi de 1:100. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução tampão TBST (TBST: solução de Tris pH= 7,4 com Tween 20 a 2%), em dois banhos de 5 minutos cada. Como soro secundário e complexo terciário para os anticorpos anti-NGF e anti-TrkA foi utilizado o kit HiDef (Cell Marque, Rocklin, CA, USA). Para a reação de revelação, as lâminas foram imersas em solução do cromógeno diaminobenzidina (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) por 10 minutos. Os cortes foram então lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer, por 1 minuto e novamente lavados em água destilada.

Após essa passagem as lâminas foram desidratadas em cadeia ascendente de etanóis e diafanizadas em 3 banhos de xilol. As lâminas foram então montadas em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), para exame ao microscópico de luz.

Os controles negativos foram os mesmos casos usados como controle positivo, que foram submetidos à reação imunoistoquímica descrita acima com exceção da incubação com o anticorpo primário, que foi substituída pela solução de BSA a 1% sem o anticorpo primário.

### **3.4 Análise Qualitativa**

Foi feita uma análise descritiva do padrão de marcação do NGF e do TrkA no grupo de glândula analisado. Além disso, o Teste Exato de Fisher foi aplicado a fim de verificar se havia alguma diferença entre o grupo de adultos e o grupo de idosos na avaliação dos parâmetros: positividade e negatividade, marcação nuclear e

citoplasmática e padrão de marcação difusa e granular, para as células serosas, mucosas e células ductais estriadas e excretoras. Em relação aos ductos, os testes foram aplicados para avaliar se havia diferença entre os grupos na marcação no lúmen. Em relação às células mucosas também foi avaliado se havia diferença entre a marcação na porção basal das células (Ver Tabelas de Contingência em Anexo) Para as análises estatísticas o nível de significância considerado foi de 5%. Os testes foram realizados através do Software Bioestat 5.0.

### 3.5 Análise Quantitativa

Realizamos as análises de quantificação através do software WCIF Image J ([http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/installing\\_imagej.htm](http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/installing_imagej.htm)). Para tanto foram selecionados 14 campos na objetiva de 200X, em uma lâmina da mesma amostra da glândula SL. Os campos para a quantificação foram obtidos em um fotomicroscópio Axiophot, câmara AxioCam MRc e software ZEN® (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany) para posteriormente serem analisados pelo Software Image J.

Em seguida abrimos o software. Abrimos as imagens adquiridas no fotomicroscópio, através do comando *File/Open*. Calibramos a imagem para o aumento em que foi obtida a imagem. Clicamos em *Plugins/Spatial calibration/Microscope Scale*. Escolhemos a objetiva do microscópio de interesse. Manter 1X1 no *Camera Binning*. Em seguida, clicamos em *Global Calibration* e demos um ok. Subtraímos o fundo, clicamos em *Process/Subtraction Background*. Mantemos *Rolling ball status* igual a 50 e deixamos clicado em *White background*, clicamos em ok. Fizemos a deconvolução da cor, clicamos em *Plugins/Colour functions/Colour deconvolution*, no *Vectors*, escolhemos H DAB e clicamos em ok. Esperamos um pouco, até abrir 3 janelas (verde, marrom e azul). Fechamos as janelas azul e verde, mantendo somente a marrom. Mantivemos a imagem original aberta (sem a deconvolução) para comparação no momento de uso da subtração (*Threshold*). Clicamos na imagem marrom e *transformamos em 8-bits*. Para tanto, clicar em *Image/Type/8-bits*. A imagem ficará preto e branco. Iniciamos o processo de seleção do que é considerado marcação positiva. Esse passo é essencial para estabelecer o intervalo de tons que serão selecionados, o qual será aplicado para todos os espécimes da amostra. Para tanto, clicamos em *Image/Adjust/Threshold*. No *Threshold*, a linha superior de ajuste refere-se aos tons mais escuros e a linha

inferior, dos tons mais claros. Selecionamos que intervalo da taxa de variação de tons *Threshold*) a ser utilizado seria de 0 a 180. Para quantificar a seleção, clicamos em *Analyze/Analyze Particles*, demos ok e anotamos a porcentagem da *Area fraction*.

Para as análises estatísticas foram consideradas as médias obtidas a partir dos valores quantificados para os 14 campos selecionados para cada amostra de glândula salivar. Para cada campo selecionado, o software Image J calcula a porcentagem de marcação da proteína em relação a área total do campo. Dessa forma os testes estatísticos foram realizados considerando-se a porcentagem relativa de marcação de cada proteína estudada. O teste estatístico escolhido para ver se havia diferença na expressão das proteínas estudadas entre o grupo de adultos (indivíduos entre 30 e 60 anos) e o grupo dos idosos (Indivíduos com mais de 60 anos) foi o de Mann-Whitney. O teste de Correlação de Pearson foi aplicado para ver se havia correlação linear entre a expressão do NGF e do TrkA e a idade dos indivíduos. O teste t de Student foi usado para mostrar se havia diferença na expressão do NGF e do TrkA nas amostras de GSL estudadas. Para as análises estatísticas o nível de significância considerado foi de 5%. Os testes foram realizado através do Software Bioestat 5.0.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Análise da expressão imunoistoquímica**

#### **4.1.1 NGF**

As análises qualitativas da expressão do NGF nas Glândulas Sublinguais (GSL) foram realizadas em 25 casos. O padrão de expressão do NGF nas GSL foi bem semelhante quando comparamos o grupo de adultos com o grupo de idosos. A análise das amostras, demonstrou que o NGF foi mais expresso nos ácinos serosos e nos ductos. Houve pouca expressão nas células mucosas (Ver Tabela de Contingência NGF em Anexos) (Figura 2). Nas células serosas, o NGF se expressou de forma predominante no citoplasma, a marcação foi tanto difusa, quanto granular (Figura 2C). Poucos casos apresentaram marcação perinuclear, e nenhum caso marcação nuclear.

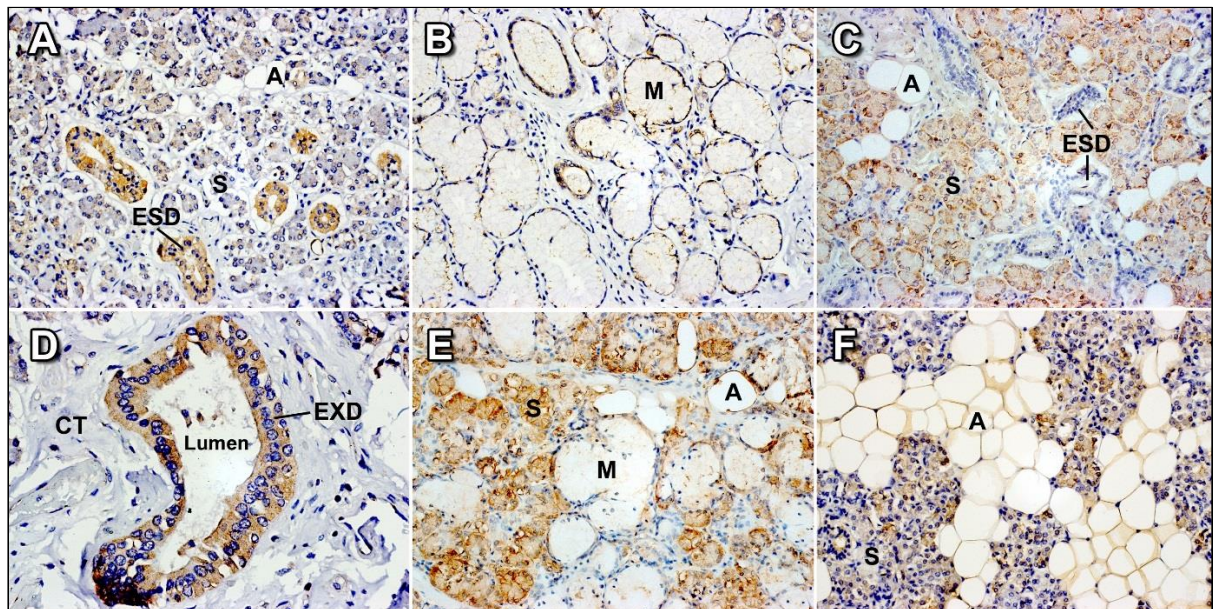
Nos ductos tanto no estriado quanto no excretor o NGF foi bastante expresso

no citoplasma da célula e o padrão de expressão foi um pouco mais difuso do que granular. Em poucos casos observamos marcação no lúmen dos ductos. Apenas um caso apresentou marcação nuclear (Figura 2 A e D).

Um número menor de casos demonstrou expressão do NGF nos ácinos mucosos (Ver Tabela de Contingência NGF em Anexos). A expressão foi tanto difusa, quanto granular, predominantemente no citoplasma, com poucos casos apresentando marcação peribasal e apenas 1 caso com marcação nuclear (Figura 2 B e E).

Os adipócitos foram positivos para o NGF na metade dos casos (Figura 2F). Em nenhum dos grupos houve marcação das células mioepiteliais.

**Figura 2.** Expressão imunohistoquímica do NGF na glândula SL.



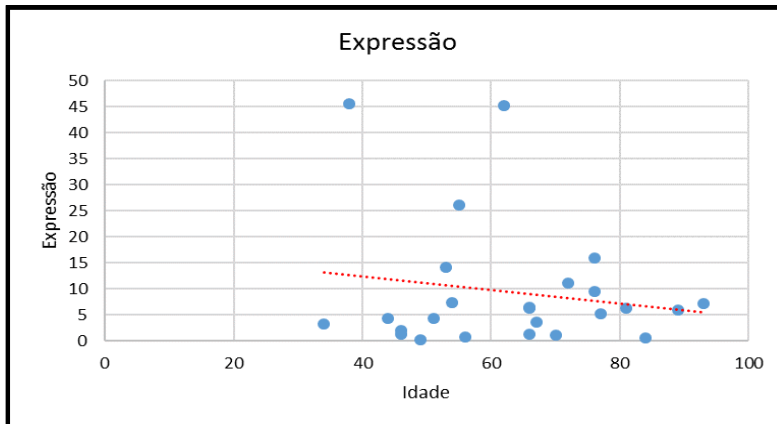
**Fonte:** próprio autor.

(A) adipócitos, (S) ácinos serosos, (ESD) ductos estriados, (M) ácinos mucosos. (CT) tecido conjuntivo e (EXD) ducto excretor.

O Teste Exato de Fisher mostrou que houve maior número de casos marcados, no citoplasma das células do ducto estriado e excretor, no grupo de adultos em comparação com o grupo de idosos ( $p=0,037$ ). Além disso, o padrão de expressão granular foi maior nas células do ducto estriado dos adultos em comparação com os idosos ( $p=0,043$ ). Para os demais parâmetros não houve diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) (Ver Tabela de Contingência NGF em Anexos).

Na análise quantitativa os resultados obtidos através do software Image J demonstraram os seguintes resultados para expressão NGF nas GSL: foram quantificados 25 casos, 11 casos de adultos (de 30 a 59 anos) e 14 casos de idosos (de 60 a 93 anos).

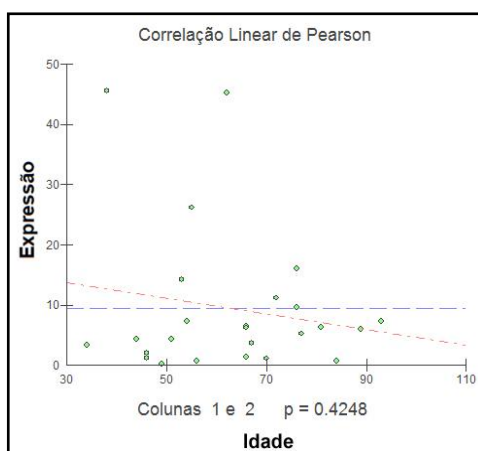
**Figura 3.** Diagrama de Dispersão da expressão do NGF nas GSL pela idade dos indivíduos.



Fonte: próprio autor.

O gráfico de dispersão demonstrou que a expressão do NGF na GSL ficou na maioria dos casos, abaixo dos 10%. O teste de Mann Whitney demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa na expressão do NGF nos dois grupos analisados,  $p=0,27$ .

**Figura 4.** Diagrama de Correlação Linear de Pearson da expressão do NGF nas GSL pela idade dos indivíduos.



Fonte: próprio autor.



O teste de correlação de Pearson mostrou não haver correlação linear entre a idade dos indivíduos e a expressão do NGF ( $r(\text{Pearson}) = -0,16$ ,  $p = 0,42$ ).

A média de expressão do NGF nas GSL foi de 9,45%, 9,97% nos adultos e 9,04% nos idosos.

#### 4.1.2 TrkA

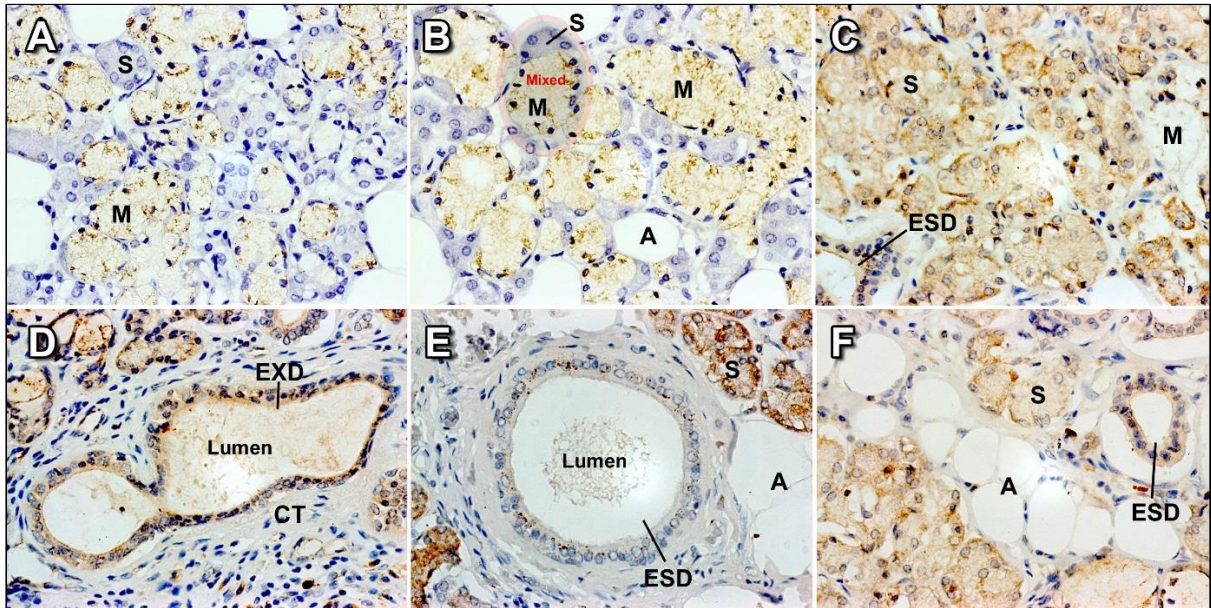
As análises qualitativas para o TrkA foram realizadas em 26 casos de GSL. O TrkA se expressou em todos os componentes glandulares. Os ácinos mucosos e os ductos foram os que mais expressaram o TrkA e o padrão de marcação foi na maioria citoplasmático e granular (Ver Tabela de Contingência TrkA em Anexos) (Figura 4). Em poucos casos houve marcação nuclear e em 1 caso marcação perinuclear.

Nas células mucosas, o TrkA se expressou de forma difusa e granular, sendo a maioria granular (Figura 4 A e B). A expressão se localizou no citoplasma e na porção peribasal das células, e em 1 único caso no núcleo.

Nas células ductais, o TrkA se expressou em praticamente todos os casos, com exceção de 1 no grupo de adultos. A marcação foi predominante no citoplasma, com poucos casos com marcação nuclear ou perinuclear. O padrão foi mais granular do que difuso. Em muitos casos foi observado marcação no lúmen (Figura 4 D, E e F). Nos ácinos serosos a marcação foi predominante citoplasmática, com apenas 1 caso com marcação perinuclear e nenhum com marcação nuclear. A marcação foi muito mais difusa do que granular (Figura 4 C e F).

Os adipócitos foram negativos para o TrkA em todos os casos de GSL tanto no grupo de adultos como no grupo de idosos, assim como as células mioepiteliais (Figura 4 F).

**Figura 5.** Expressão imunohistoquímica do TrkA na glândula SL.



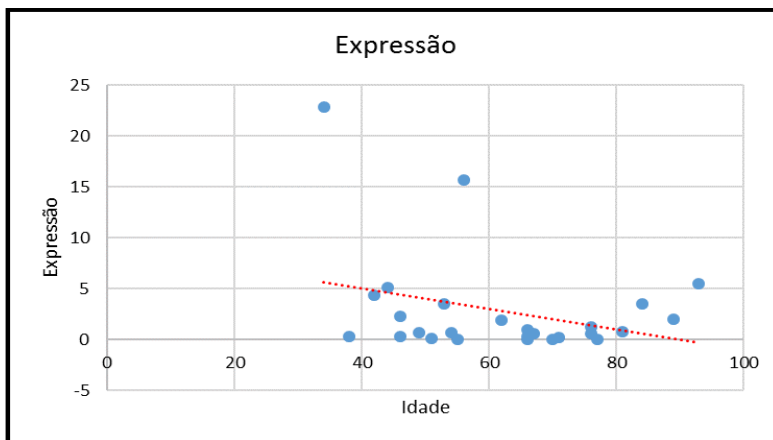
**Fonte:** próprio autor.

(A) Adipócitos, (S) ácidos serosos, (ESD) ductos estriados, (M) ácidos mucosos, (CT) tecido conjuntivo e (EXD) ducto excretor.

O Teste Exato de Fisher mostrou que houve diferença estatisticamente significativa a nível dos 5%, entre os grupos, na marcação granular das células do ducto estriado, e que houve maior número de casos com esse padrão no grupo de idosos do que no grupo de adultos ( $p=0,033$ ). Em contrapartida houve diferença na marcação difusa das células do ducto estriado, que teve maior número de casos com esse padrão no grupo de adultos do que no grupo de idosos ( $p=0,008$ ). Para os demais parâmetros não houve diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) (Ver Tabela de Contingência TrkA em Anexos)

A análise quantitativa obtida através do software Image J demonstrou os seguintes resultados para expressão TrkA nas GSL: foram analisados 26 casos, 12 casos de adultos (de 30 a 59 anos) e 14 casos de idosos (de 60 a 93 anos).

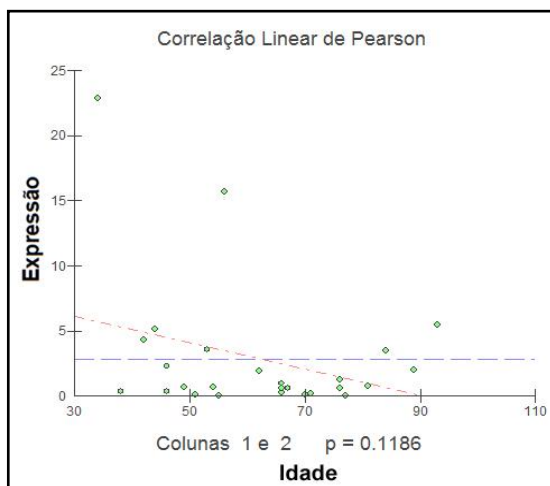
**Figura 6.** Diagrama de Dispersão da expressão do TrkA nas GSL pela idade dos indivíduos.



**Fonte:** próprio autor.

O gráfico de dispersão demonstrou que a expressão do TrkA nas GSL foi baixa e ficou na maioria dos casos, abaixo dos 5%. O teste de Mann Whitney mostrou não haver diferença estatisticamente significativa na expressão do TrkA nas GSL entre os dois grupos analisados,  $p=0,15$ .

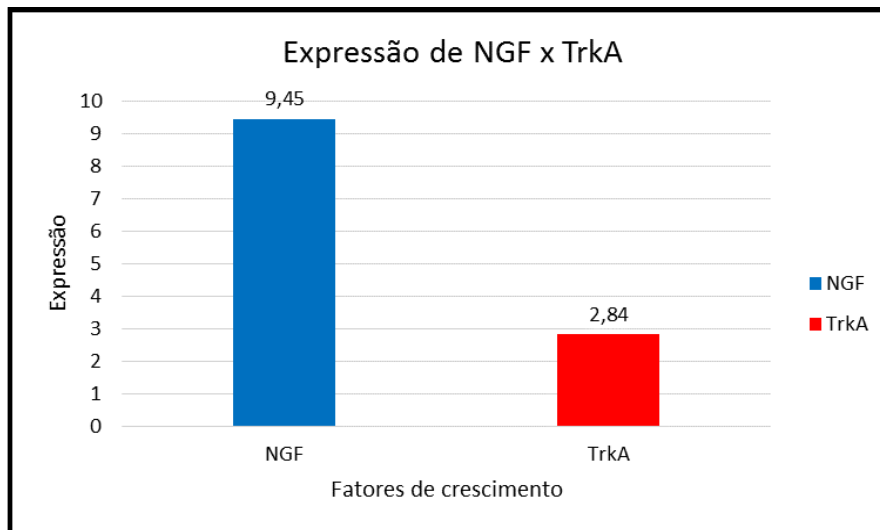
**Figura 7.** Diagrama de Correlação Linear de Pearson da expressão do TrkA nas GSL pela idade dos indivíduos.



**Fonte:** próprio autor.

O teste de correlação de Pearson mostrou não haver correlação linear entre a idade dos indivíduos e a expressão do TrkA ( $r(\text{Pearson}) = -0,31$ ,  $p=0,11$ ). A média de expressão do TrkA foi de 2,84% nas GSL, 4,67% no grupo de adultos e 1,27% no grupo de idosos.

**Figura 8.** Diagrama da média de expressão do NGF e TrkA nas GSL de acordo com cada caso avaliado.



Fonte: próprio autor.

O teste t de Student mostrou que houve uma maior expressão do NGF do que do TrkA nas amostras de GSL estudadas ( $p=0,04$ ), (Ver tabela de Expressão de Fatores de Crescimento em Anexos)

## 5. DISCUSSÃO

Muitos trabalhos têm demonstrado que as glândulas salivares são uma importante fonte de fatores de crescimento como o NGF, o TGF, o IGF e o FGF, que exercem um papel importante no controle neuroendócrino do organismo e na homeostasia dos tecidos lesionados da orofaringe e do trato digestório, além de exercerem uma ação autócrina e parácrina nas próprias glândulas salivares (KAGAMI *et al.*, 2000).

O NGF é um fator essencial na diferenciação das células neurais, entretanto os alvos para o NGF incluem células de origem não-neural, como as células pancreáticas tipo beta, células do ovário e células pituitárias (TAKEUCHI *et al.*, 2003). A alteração dos níveis de NGF em vários tecidos após desnervação ou cultura *in vitro* foi tomada como evidência de seu importante papel na regeneração neuronal (RICHARDSON and EBENDAL, 1982 apud ZELLES *et al.*, 1995). O papel patofisiológico do NGF nas glândulas salivares ainda não foi totalmente elucidado. Takeuchi *et al* (2003) mostrou que o sistema NGF-TrkA tem um papel importante na diferenciação de células acinares de parótida cultivadas *in vitro*. Além disso, existe

um conceito na literatura de que os nervos sensoriais e autônomos que enervam as glândulas salivares contém muitos neuropeptídeos que podem ter um papel complementar no desenvolvimento das células acinares e na sua maturação funcional (HÖKFELT, 1991).

Nesse trabalho estudamos a expressão imunoistoquímica do NGF e do TrkA nas GSL. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas, a fim de comparar se haviam diferenças na expressão dessas proteínas entre o grupo de adultos e o grupo de idosos. A literatura mostra que estudos sobre esse tema são importantes, pois possivelmente esses fatores tem um papel muito importante na manutenção da integridade das mucosas oral e gastrointestinal e também na manutenção das próprias glândulas salivares (ZELLES *et al.*, 1995). A diminuição na produção e secreção desses fatores pode estar relacionada ao processo de envelhecimento e consequentemente a distúrbios na manutenção e integridade das glândulas salivares, da mucosa do aparelho digestivo e no processo de digestão (ZELLES *et al.*, 1995).

Observando os dados da expressão do NGF, nas GSL observamos que a marcação foi mais expressiva nos ácinos serosos e nos ductos do que nos ácinos mucosos. Naesse *et al.* (2013), analisaram a expressão do NGF nas GSL e observaram que ele teve maior expressão no citoplasma das células ductais, corroborando com os dados obtidos através desse estudo. As análises das GSL mostraram que o padrão de expressão nas células ductais foi difuso e citoplasmático com pouca marcação nuclear, dados também encontrados no estudo de Naesse *et al.* (2013). A pesquisa de Schenck *et al.* (2017) corrobora com os resultados de Naesse *et al.* (2013) ao afirmar que a expressão de NGF foi mais visualizada nas células ductais do que nas células acinares. Entretanto, o estudo de de Vicente *et al.* (1998) mostrou que não houve expressão do NGF nas glândulas sublinguais humanas e tampouco nas glândulas submandibulares e parótidas, indo contra os resultados do nosso estudo.

Comparando a expressão quantitativa do NGF nas GSL, no grupo de adultos com o grupo de idosos, observamos que não foram detectadas diferenças significativas, o que foi confirmado pelo teste de Mann Whitney. O teste de Correlação de Pearson, demonstrou que não houve correlação linear entre o aumento da idade e o aumento ou a diminuição da expressão do NGF. Entretanto,

quando analisamos isoladamente as células dos ductos estriado e excretor observamos que houve uma maior número de casos que expressaram o NGF no citoplasma celular no grupo de adultos comparado ao grupo de idosos, além disso o padrão granular nessas células foi maior no grupo de adultos do que no grupo de idosos. Esse dado sugere que exista alguma alteração na produção e expressão desse fator durante o processo de envelhecimento e que, possivelmente essas alterações estejam acontecendo às custas do componente ductal. A maior quantidade do padrão granular observada nas células ductais do grupo de adultos, corrobora com a hipótese de que ocorra uma diminuição da produção do NGF nas células ductais com o processo de envelhecimento. Assim, possivelmente em indivíduos idosos deve haver uma maior expressão do NGF nas células serosas e mucosas e uma menor expressão nas células ductais, visto que nas análises quantitativas não foi possível identificar diferenças na expressão do NGF entre o grupo de adultos e o grupo de idosos. O trabalho de Nam *et al.*, 2007, mostrou que houve diminuição nas concentrações de NGF da saliva produzida pelas glândulas submandibulares de humanos com o aumento da idade, entretanto essa diminuição do NGF não foi observada na saliva produzida pelas glândulas parótidas e quando os pesquisadores consideraram o volume total de saliva produzida por todas as glândulas salivares.

Quando analisamos a expressão do TrkA nas GSL verificamos que também houve uma expressão mais significativa nas células ductais e células mucosas quando comparamos com as células serosas. Naesse *et al.* (2013) analisaram a expressão do TrkA em GSL e verificaram que essa proteína se expressou na maioria dos casos nas células ductais e que houve uma pequena expressão dessa proteína nas células acinares mucosas e serosas. Já no estudo de Vicente *et al.* (1998) o TrkA foi expresso apenas nos ductos estriados e excretores, com intensidades variáveis. Schenck *et al.* (2017) também observou que o TrkA se expressou mais fortemente nos ductos de todos os tipos de glândulas salivares humanas e que houve uma escassa expressão nos ácinos. O teste de Fisher demonstrou que nas células do ducto estriado o padrão granular foi maior no grupo de idosos e o padrão difuso foi maior no grupo de adultos. Analisando os dados quantitativos observamos que não houve diferença na expressão do TrkA, quando comparamos o grupo de adultos com o grupo de idosos. Além disso não houve

correlação entre o aumento da idade e o aumento ou a diminuição da expressão do TrkA.

Quando analisamos as células mioepiteliais observamos que não houve expressão do NGF e do TrkA em nenhum dos casos analisados, contrariando o estudo de Naesse *et al.* (2013), no qual as células mioepiteliais se expressaram positivamente para o NGF, e o estudo de Vicente *et al.* (1998) onde as células mioepiteliais se expressaram positivamente para o TrkA.

O teste t, mostrou que a expressão do NGF foi muito maior do que a do TrkA nas amostras de GSL analisadas, mostrando que nesse grupo de glândulas há maior expressão do NGF do que do seu receptor.

## **6. CONCLUSÃO**

- 1- O NGF se expressou tanto nas células serosas, como nas células mucosas e nos ductos.
- 2- Houve maior número de casos marcados pelo NGF no citoplasma das células do ducto estriado e excretor, e do grupo de adultos em comparação com o grupo de idosos.
- 3- O TrkA se expressou tanto nas células serosas, como nas células mucosas e nos ductos.
- 4- As análises quantitativas demonstraram que não houve diferença na expressão do NGF e do TrkA entre o grupo de adultos e o grupo de idosos.
- 5- Houve uma maior expressão do NGF do que a do TrkA nas amostras de GSL analisadas.

## 7. REFERÊNCIAS

AMANO, O. *et al.* Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands; **Overview of the Japan Salivary Gland Society-Sponsored Workshop**, Japan, v. 45, n. 5, p. 241-250, Sep. 2012. <http://dx.doi.org/10.1267/ahc.12013>.

AMANO, O. *et al.* Basic fibroblast growth factor in rat salivary glands. **Cell Tissue Res.**, Ishikawa, Japan, v. 273, n.3, p. 467–474, Sep. 1993. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00333701>.

ANTONELLI, A; BRACCI-LAUDIERO, L; ALOE, L. Altered plasma nerve growth factor-like immunoreactivity and nerve growth factor-receptor expression in human old age. **Gerontology**, Institute Of Neurobiology, Rome, Italy, v. 49, n. 3, p. 185-190, May/Jun. 2003.

BARBACID, M. Neurotrophic factors and their receptors. **Curr Opin Cell Biol.**, Princeton, USA, v. 7, p. 148-155, Apr. 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80022-0](http://dx.doi.org/10.1016/0955-0674(95)80022-0).

BARDE, Y. A. Death of injured neurons caused by the precursor of nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, USA v. 101, n. 16, p. 5703-5704, Apr. 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401374101>.

BARKA, T. Biologically active polypeptides in submandibular glands. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, [SI.], v. 28, n. 8, p.836-859, Ago. 1980. <http://dx.doi.org/10.1177/28.8.7003006>.

BEN-ARYEH, H. *et al.* Clinical Science Whole-saliva Secretion Rates in Old and Young Healthy Subjects. **Journal of Dental Research**, [SI.], Israel, v. 63, n. 9, p.1147-1148, Sep. 1984. <http://dx.doi.org/10.1177/00220345840630091001>.

BERG, T; JOHANSEN, L; POULSEN, K. Exocrine and endocrine release of kallikrein after reflex-induced salivary secretion. **Acta Physiol Scand**, Norway, v. 139 p. 29-37, May. 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1990.tb08894.x>.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci**, New York, USA, v. 4, n. 4, p. 299-309, Apr. 2003. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>.



CIANCIO, SG. Medications' impact on oral health. **J Am Dent Assoc.**, New York, USA, v. 135, n. 10, p. 1140-1448. Oct. 2004. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0055>.

DESCAMPS, S. *et al.* Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. **J Biol Chem**, France, v. 276, n. 21, p. 17864-17870, May. 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010499200>.

FEIO, M; SAPETA, P. Xerostomia em Cuidados Paliativos. **Acta Med Port.**, Espírito Santo, ES, Brasil, v. 18, p. 459-466, 2005.

FOX, P. C. *et al.* Xerostomia: evaluation of a symptom with increasing significance. **J Am Dent Assoc.**, v. 110, n. 4, p. 519- 525, Apr. 1985. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1985.0384>.

GARGANO, N; LEVI, A.; ALEMA, S. Modulation of nerve growth factor internalization by direct interaction between p75 and trkA receptors. **J. Neurosci. Res.**, Rome, Italy, v. 50, p. 1-12, Oct. 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19971001\)50:1%3C1::AID-JNR1%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19971001)50:1%3C1::AID-JNR1%3E3.0.CO;2-N).

GÓMEZ-PINILLA, F; COTMAN, CW; NIETO-SAMPEDRO, M. NGF receptor immunoreactivity in aged rat brain. **Brain Res.**, California, v. 479, n.2, p. 255–262, Feb. 1989. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91626-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91626-0).

GREENSPAN, D. Xerostomia: diagnoses and management. **Oncology**, Williston Park, N.Y., USA, v. 10, n. 3, p. 7-11, Mar. 1996.

HANSSON, H. A., TUNHALL, S. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. **Proc Natl Acad Sci. USA**, V. 83, P. 6184-6187, 1986.

HOEHNER, J. C. *et al.* Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma. **Am J Pathol.**, Sweden, v. 147, n. 1, p. 102-113, Jul. 1995.

HÖKFELT, T. Neuropeptides in perspective the las ten years. **Neuro**, Srockholm, Sweden, v. 7, n. 6, p. 867-879, Dec. 1991. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90333-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90333-U).

IBÁÑEZ, C. F. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. **Trends Neurosci**, Stockholm, Sweden, v. 21, n. 10, p. 438-444, Oct. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(98\)01266-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(98)01266-1).

JAEGER, R. G.; FREITAS, V. M. Histologia das Glândulas Salivares. *In*: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. de C. (Org.). **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Edgar Bluncher, 2016. cap. 10, p. 227-246. <https://doi.org/10.5151/9788580391893-10>.

KAGAMI, H. *et al.* Salivary Growth Factors in Health and Disease. **Advances in Dental Research**, v. 14, n. 1, p 99–102, 2000. <https://doi.org/10.1177/08959374000140011601>.

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B. The diagnostic application of saliva – a review. **Crit. Rev Oral Biol Med.**, New York, USA, v. 13, n. 2, p 197-212, 2002.

LEE, H. Y.; WONG, T. D. Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. **Am J Dent.**, Los Angeles, California, USA, v. 22, n. 4, p 241-248, Aug. 2009.

LIMA, D. P.; DINIZ, D. G.; MOIMAZ, S. A.; SUMIDA, D. H.; OKAMOTO, A. C. Saliva: reflection of the body. **International Journal of Infectious Diseases**, Araçatuba, SP, Brasil, v. 14, n. 3, p. 184-188, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.04.022>.

LOO, A. J. *et al.* Comparative human salivary and plasma proteomes. **J Dent Res.**, Los Angeles, California, USA, v. 89, n. 10, p. 1016-1023, Aug. 2010. <https://dx.doi.org/10.1177%2F0022034510380414>.

MARTINEZ-MADRIGAL, F.; MICHEAU, C. Histology of the major salivary glands. **The American Journal of Surgical Pathology**, Si, Villejuif, France, v. 13, n. 10, p. 879-899, Oct. 1989. <https://dx.doi.org/10.1097/00000478-198910000-00008>.

MATHISON, R; DAVISON, J. S.; BEFUS, A. D. Neuroendocrine regulation of inflammation and tissue repair by submandibular glands factors. **Immunol Today**, Alberta, Canada, v. 15, n. 11, p. 527-532, Nov. 1994.

McDONALDS, N.Q.; CHAO, M.V. Structural determinants of neurotrophin action. **J. Biol. Chem.**, London, United Kingdom, v. 270, n. 34, p. 19669-19672, Aug. 1995. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.34.19669>.

MEYER J. *et al.* The ptyalin content of human saliva in old age. **Amer. J. Physiol.**, Chicago, v. 119, p. 600, Jun. 1937. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1937.119.3.600>.

MILLER, D. A. *et al.* Complementary DNA cloning of the murine transforming growth factorbeta 3 (TGF beta 3) precursor and the comparative expression of TGF beta 3 and TGF beta 1 messenger RNA in murine embryos and adult tissues. **Mol Endocrinol**, Nashville, Tennessee, v. 3, n. 12, p. 1926-1934, Dec. 1989. <https://dx.doi.org/10.1210/mend-3-12-1926>.

MIN, H; MONTECINO-RODRIGUEZ, E; DORSHKIND, K. Effects of aging on early B- and T-cell development. **Immunol Rev.**, Los Angeles, California, USA, v. 205, p. 7-17, Jun. 2005. <https://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00263.x>.

MIRANDA-RIUS, J.; BRUNET-LLOBET, L.; LAHOR-SOLER, E.; FARRÉ, M. Salivary secretory disorders, inducing drugs, and clinical management. **Int. J. Med. Sci.**, Barcelona, Spain, v. 12, n. 10, p. 811-824, Sep. 2015. <https://dx.doi.org/10.7150/ijms.12912>.

MORIS, G.; VEGA, J. A. Neurotrophic factors: basis for their clinical application. **Neurologia**, Mieres, Austrias, v. 18, n. 1, p. 18-28, Jan/Feb. 2003.

NAESSE, E. P. *et al.* Distribution of nerve growth factor, pro-nerve growth factor, and their receptors in human salivary glands. **European Journal of Oral Sciences**, v. 121, p. 13-20, Dec. 2012-2013. <https://doi.org/10.1111/eos.12008>.

NAGLER, R. M. Salivary Glands and the Aging Process: Mechanistic Aspects, Health-Status and Medicinal-Efficacy Monitoring. **Biogerontology**, [Sl.], Haifa, Israel, v. 5, n. 4, p. 223-233, Ago. 2004.

<http://dx.doi.org/10.1023/b:bgen.0000038023.36727.50>.

NAM, J. *et al.* Nerve growth factor concentration in human saliva. **Oral Diseases**, v. 13 p. 187-192, 2007. DOI:10.1111/j.1601-0825.2006.01265.x.

NANCI, A. **Ten Cate Histologia Oral: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 414.

NAPEÑAS, J. J.; BRENNAN, M. T.; FOX, P. C. Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). **Odontology**, Charlotte, NC, USA, v. 97, n. 2, p. 76-83, Jul. 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s10266-008-0099-7>.

NELSON, J. D. *et al.* Oral pilocarpine for symptomatic relief of keratoconjunctivitis sicca in patients with Sjögren's syndrome. The MGI PHARMA Sjögren's Syndrome Study Group. **Adv. Exp. Med. Biol**, USA, v. 438, p. 979-983, 1998.

PAPAS, A. S. *et al.* Oral pilocarpine for symptomatic relief of dry mouth and dry eyes in patients with Sjögren's syndrome. **Adv. Exp. Med. Biol.**, Boston, Massachusetts, USA., v. 438, p. 973-978, 1998. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-5359-5\\_139](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-5359-5_139).

PENSCHOW, J. D.; COGHLAN, J. P. Secretion of glandular kallikrein and renin from the basolateral pole of mouse submandibular duct cells: an immunocytochemical study. **J Histochem Cytochem**, Parkville, Victoria, Australia, v. 41, p. 95-103, Jan. 1993. <http://dx.doi.org/10.1177/41.1.8417114>.

PEZET, S.; MACMAHON, S. B. Neurotrophins: mediators and modulators of pain. **Annu Rev Neurosci**, London, United Kingdom, v. 29, p. 507-538, 2006. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112929>.

SCHENCK, K. *et al.* The role of nerve growth factor (NGF) and its precursor forms in oral wound healing. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, n. 2, p. E386, Feb. 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18020386>.

SCOTT, J. Structure and Function in Aging Human Salivary Glands. **Gerodontology**, [Sl.], v. 5, n. 3, p. 149-158, Dec. 1986. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-2358.1986.tb00062.x>.

SCULLY, C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. **Oral Diseases**, London, United Kingdom, v. 9, n.4, p. 165-176, Jul. 2003.

SCULLY, J. L.; OTTEN, L. NGF: Not just for neurons. **Cell Biol. Int.**, Switzerland, v. 19, n.5, p. 459-469, May. 1995. <http://dx.doi.org/10.1006/cbir.1995.1089>.

SHIBAYAMA, E.; KOIZUMI, H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. **Am J Pathol**, Kawasaki, Japan, v. 148, n. 6, p. 1807-1818, Jun. 1996.

SOFRONIEW, M. V.; HOWE, C. L.; MOBLEY, W. C. Nerve Growth Factor signaling, neuroprotection, and neural repair. **Annu Rev. Neurosci**, Los Angeles, California, USA, v. 24, p. 1217- 1281, 2001. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1217>.

SREEBNY, L. M. Saliva in health and disease: an appraisal and update. **Internacional Dental Journal**, v. 50, p. 140-61, Sep. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2000.tb00554.x>.

SREEBNY, L. M.; SCHWARTZ, S. S. A reference guide to drugs and dry mouth - 2nd edition. **Gerodontology**, New York, USA, v. 14, p. 33-47, Jul. 1997.

STRONG, B. C.; JOHNS, M.; JOHNS, M. E. Anatomy and Physiology of the salivary glands. *In*: BAILEY, B. J. **Head and Neck surgery**. Otolaryngology, 2006. p. 519-526.

TAKEUCHI, T. *et al.* Role of nerve growth factor in the regulation of parotid cell differentiation induced by rat serum. **Biochemical Pharmacology**, Buffalo, NY, USA, v. 65, n. 9, p 1507-1513. Apr. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00116-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00116-3).

TERENGHI, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **The Journal of Anatomy**, Sussex, UK, v. 194, p. 1-14, Jan. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19410001.x>.

TROMBELLI, L. *et al.* Oral symptoms in the climateric. A prevalence study. **Minerva Stomatologica**, Italy, v. 41, n. 11, p. 507-13, Nov. 1992.

VARGA, G. Physiology of the salivary glands. **Surgery (Oxford)**, v. 30, n. 11, p. 578-583, Nov. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2012.09.010>.

VEERMAN, E. C. I. *et al.* Human glandular salivas: their separate collection and analysis. **Eur. J. Oral Sci.**, The Netherlands, v. 104, p. 346-352, Ago. 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00090.x>.

VICENTE, J. C. de *et al.* Immunohistochemical localization of neurotrophins and neurotrophin receptors in human and mouse salivary glands. **Annals of Anatomy**, Spain, v. 180, n. 2, p. 157-163, Apr. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(98\)80016-2](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(98)80016-2).

VISSINK, A; SPIJKERVET, F. K. L.; AMERONGEN, A. V. N. Aging and saliva: A review of the literature. **Special Care in Dentistry**, [Sl.], v. 16, n. 3, p. 95-103, May. 1996. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1754-4505.1996.tb00842>.

VUKOSAVLJEVIC. D.; CUSTODIO, W.; SIQUEIRA, L. W. Salivary proteins as predictors and controls for oral health. **J. Cell Commun. Signa.**, v. 5, n. 4, p. 271-275, Dec. 2011. <https://doi.org/10.1007/s12079-011-0151-1>.

ZELLES, T. *et al.* Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. **J Dent Res.**, Florida, Gainesville, FL, v. 74, p. 1826-1832, Dec.1995. <https://doi.org/10.1177/00220345950740120301>.

## ANEXOS

Tabela de Contingência - NGF								
			Cél. Serosa	Cél. Mucosa	Ducto Estriado	Ducto Excretor	Adipócitos	Cél. Mioepitelial
Houve marcação?	Adultos	Sim	11	8	11	11	4	0
		Não	0	3	0	0	7	11
	Idosos	Sim	13	7	9	9	8	0
		Não	1	7	5	5	6	14
Marcação citoplasmática	Adultos	Sim	11	8	11	11	***	***
		Não	0	3	0	0	***	***
	Idosos	Sim	13	7	9	9	***	***
		Não	1	7	5	5	***	***
Marcação difusa	Adultos	Sim	11	6	9	10	***	***
		Não	0	5	2	1	***	***
	Idosos	Sim	13	6	9	8	***	***
		Não	1	8	5	6	***	***
Marcação granular	Adultos	Sim	8	6	6	6	***	***
		Não	3	5	5	5	***	***
	Idosos	Sim	11	3	2	6	***	***
		Não	3	11	12	8	***	***
Marcação nuclear	Adultos	Sim	0	1	0	1	***	***
		Não	11	10	11	10	***	***
	Idosos	Sim	0	0	0	0	***	***
		Não	14	14	14	14	***	***
Marcação perinuclear/ peribasal	Adultos	Sim	4	2	***	***	***	***
		Não	7	9	***	***	***	***
	Idosos	Sim	6	1	***	***	***	***
		Não	8	13	***	***	***	***
Marcação lúmen	Adultos	Sim	***	***	1	2	***	***
		Não	***	***	10	9	***	***
	Idosos	Sim	***	***	4	3	***	***
		Não	***	***	10	11	***	***

Tabela de Contingência - TrkA								
			Cél. Serosa	Cél. Mucosa	Ducto Estriado	Ducto Excretor	Adipócitos	Cél. Mioepitelial
Houve marcação?	Adultos	Sim	9	12	11	12	0	0
		Não	3	0	1	0	12	12
	Idosos	Sim	11	13	14	14	0	0
		Não	3	1	0	0	14	14
Marcação citoplasmática	Adultos	Sim	9	12	10	12	***	***
		Não	3	0	2	0	***	***
	Idosos	Sim	11	13	14	14	***	***
		Não	3	1	0	0	***	***
Marcação difusa	Adultos	Sim	9	7	9	7	***	***
		Não	3	5	3	5	***	***
	Idosos	Sim	11	6	3	3	***	***
		Não	3	8	11	11	***	***
Marcação granular	Adultos	Sim	1	11	8	11	***	***
		Não	11	1	4	1	***	***
	Idosos	Sim	4	13	14	13	***	***
		Não	10	1	0	1	***	***
Marcação nuclear	Adultos	Sim	0	0	0	0	***	***
		Não	12	12	12	12	***	***
	Idosos	Sim	0	1	3	2	***	***
		Não	14	13	11	12	***	***
Marcação perinuclear/ peribasal	Adultos	Sim	0	5	***	***	***	***
		Não	12	7	***	***	***	***
	Idosos	Sim	1	3	***	***	***	***
		Não	13	11	***	***	***	***
Marcação lúmen	Adultos	Sim	***	***	3	9	***	***
		Não	***	***	9	3	***	***
	Idosos	Sim	***	***	6	8	***	***
		Não	***	***	8	6	***	***



<b>Tabela de Expressão dos Fatores de Crescimento</b>		
<b>Caso</b>	<b>NGF</b>	<b>TrkA</b>
1	4,41	0,09
4	26,2	0,06
5	11,2	0,2
6	3,67	0,6
7	9,63	1,27
8	45,59	0,36
9	16	0,63
10		4,35
11	0,64	3,52
12	0,74	15,69
13	1,27	0,34
14	7,37	0,65
16	1,13	0,08
17	6,34	0,78
18	5,25	0,03
19	0,19	0,68
20	6,54	0,3
22	2,02	2,29
23	6,04	2,01
24	4,34	5,16
25	1,35	22,9
26	7,27	5,48
27	6,25	0,97
28	45,3	1,92
29	3,3	22.89
30	14,2	3,54