



UNIVERSIDADE
FERNANDO
PESSOA

AVALIAR O EFEITO DA SALIVA ARTIFICIAL EM LINHAS CELULARES TUMORAIS E NÃO TUMORAIS

[Evaluate the effect of artificial saliva on tumor and non-tumor cell lines]

Dissertação de Mestrado

[Mestrado Integrado em Medicina Dentária]

Antonio Cimbasso

Orientador:

Ana Catarina Rocha, MS

Co-Orientador:

Professor Douror Ruben Fernandes, PhD

Junho 2024

AVALIAR O EFEITO DA SALIVA ARTIFICIAL EM LINHAS CELULARES TUMORAIS E NÃO TUMORAIS

[Evaluate the effect of artificial saliva on tumor and non-tumor cell lines]

Dissertação de Mestrado

[Mestrado Integrado em Medicina Dentária]

Antonio Cimbasso

Orientador:

Ana Catarina Rocha, MS

Co-Orientador:

Professor Doutor Ruben Fernanes

Junho 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer o meu orientador o prof. Ruben Fernandes e a minha co-orientadora a prof. Ana Catarina, para a possibilidade de trabalhar na universidade da faculdade e para a imensa paciência e disponibilitàe nestes meses de trabalho.

Il fatidico e tanto atteso giorno della mia laurea è finalmente arrivato: un traguardo alla fine di un percorso impegnativo, a tratti difficile e complicato, in un paese straniero, con una lingua a me sconosciuta, lontano migliaia di chilometri da casa. Eppure nonostante tutto ce l' ho fatta e per questo devo ringraziare certamente me stesso, la mia ostinazione e forza di volontà per averci sempre creduto e non aver mai mollato ma è anche vero che non ce l' avrei fatta senza la fiducia e l' amore delle persone a me vicine.

Persone a cui voglio dire grazie.

Per prima a mia mamma Daniela, che mi ha sempre supportato e sopportato: grazie per essermi sempre stata vicina, per aver visto e vedere sempre il meglio in me, per la tua fiducia e per la tua inesauribile pazienza.

Grazie alle mie nonne Rina e Giorgina, che anche da lontano hanno offerto il loro sostegno senza mai ricevere nulla in cambio. Grazie per essere fonte di saggezza e amore incondizionato.

A mia sorella Giorgia, sempre pronta ad aiutarmi e a tendermi la mano. Anche se siamo cresciuti, rimarrai sempre quella bambina che aiutava il suo fratellino un po' imbranato ad allacciarsi le scarpe. Grazie per l' amore che mi dimostri continuamente; non posso pensare a una vita senza di te.

Un grazie ai miei zii e zie per l' affetto ricevuto in questi anni e per il grande legame che ci unisce come famiglia.

Ai miei cugini Marina e Matteo: anche se non ci vediamo spesso, farete sempre parte del mio cuore e della mia vita.

A Stefano, un fratello, un' anima gemella, più che un cugino. Grazie per tutti i momenti passati insieme e che ancora passeremo. La spensieratezza ha senso solo se tu sei con me.

Ai miei migliori amici Emanuele, Simone, Vittorio, Gino, e Mino, per la loro amicizia e lealtà, per esserci sempre stati in questi anni, sempre uniti e compatti. Grazie di

considerarmi vostro amico; solo quando ci ritroviamo tutti insieme mi sento davvero a casa.

A Federico, grazie per essere stato un amico, per aver condiviso storie e serate insieme. Questi anni universitari sono stati più leggeri con te.

Ad Asia, prima di tutto amica oltre che collega: grazie per le serate di studio, di scherzi e anche di litigate trascorse assieme. Senza il tuo aiuto non sarei arrivato fin qui. Sarai sempre una parte importante della mia vita.

Un ringraziamento al dott. Donald Lorenzi e alla dottoressa Manuela quarta, per il loro supporto professionale. Entrambi esempio di professionalità e dedizione

Infine dedico questa laurea a mio padre Paolo, che ha sempre creduto in me, l'unica persona che riesce a vedere la mia parte migliore e che mi sprona a usarla per dare sempre il meglio. Grazie per tutti i sacrifici fatti per me, spero solo di poterli ripagare tutti e diventare la metà dell'uomo che sei tu oggi.

Grazie a tutti voi.

RESUMO

A xerostomia, conhecida como boca seca, é uma condição que pode comprometer significativamente a defesa do nosso organismo. A saliva não serve apenas para facilitar a ingestão dos alimentos, desempenhando um papel essencial na proteção dos dentes e da cavidade oral. A xerostomia está frequentemente associada à hipossalivação, que pode ser causada por doenças ou resultar de tratamentos como radioterapia ou quimioterapia. Não há uma cura para a xerostomia, mas existem substitutos salivares, como a saliva artificial, para melhoria dos sintomas e qualidade de vida dos pacientes. No entanto, a complexidade da saliva natural dificulta a sua reprodução em laboratório. Estudos mostram que a saliva desempenha um papel complexo na resposta celular, envolvendo inflamação nos tecidos orais, essencial para a cicatrização de feridas. A saliva também induz alterações em genes e proteínas inflamatórias, sugerindo a sua capacidade de desencadear respostas inflamatórias mediadas por vias de sinalização específicas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de saliva artificial na viabilidade e motilidade de linhas celulares tumorais e não tumorais, e compreender a sua influência na expressão de genes envolvidos nas principais vias de sinalização celular. Para isso foram realizados ensaios de viabilidade celular usando o método MTT, avaliação da migração celular através do método de *injury* e análise da expressão gênica por RT-qPCR. O estudo revelou que a saliva artificial teve um efeito citotóxico significativo em ambas as linhas celulares nas menores diluições (4x, 8x, 10x e 16x). Além disso, a presença de saliva artificial influenciou a expressão de genes como EGFR, KRAS, PTEN, mTOR e PI3K, particularmente na linha celular tumoral. Estes resultados demonstram que a saliva artificial pode promover a proliferação e sobrevivência das células tumorais, salientando a necessidade de mais investigação para melhorar a formulação de saliva artificial para uso terapêutico.

Palavras-chaves: “saliva”, “saliva artificial”, “xerostomia”, “radioterapia” e “interleucinas”.

ABSTRACT

Xerostomia, known as dry mouth, is a condition that can significantly compromise our body's defense mechanisms. Saliva not only facilitates food ingestion but also plays an essential role in protecting teeth and the oral cavity. Xerostomia is often associated with hyposalivation, which can be caused by diseases or result from treatments such as radiotherapy or chemotherapy. There is no cure for xerostomia, but saliva substitutes, like artificial saliva, can improve symptoms and the quality of life for patients. However, the complexity of natural saliva makes it difficult to reproduce in a laboratory. Studies show that saliva plays a complex role in cellular response, involving inflammation in oral tissues, which is essential for wound healing. Saliva also induces changes in genes and inflammatory proteins, suggesting its ability to trigger inflammatory responses mediated by specific signaling pathways. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of artificial saliva on the viability and motility of tumoral and non-tumoral cell lines and to understand its influence on the expression of genes involved in major cellular signaling pathways. For this purpose, cell viability assays using the MTT method, cell migration assessment through the injury method, and gene expression analysis by RT-qPCR were performed. The study revealed that artificial saliva had a significant cytotoxic effect on both cell lines at the lowest dilutions (4x, 8x, 10x, and 16x). Additionally, the presence of artificial saliva influenced the expression of genes such as EGFR, KRAS, PTEN, mTOR, and PI3K, particularly in the tumor cell line. These results demonstrate that artificial saliva may promote the proliferation and survival of tumor cells, highlighting the need for further research to improve the formulation of artificial saliva for therapeutic use.

Keywords: "artificial saliva", "saliva", "xerostomia", "radiotherapy", and "interleukin"

INDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO	3
2.1. Composição da Saliva Natural.....	3
2.2. Principais funções da saliva.....	3
2.2.1. Capacidade tampão	3
2.2.2. Lubrificação/viscoelasticidade	4
2.2.3. Remineralização dentária	4
2.2.4. Função antimicrobiana	5
2.2.5. Vírus e fungos	6
2.2.6. Paladar.....	6
2.2.7. Digestão e formação do bolo alimentar.....	7
2.3. Funções da saliva não correlacionadas com moléculas específicas.....	7
2.3.1. Humidade	7
2.3.2. Odor.....	8
2.3.3. Sabor.....	8
2.3.4. <i>Clearence</i>	9
2.4. Disfunção e distúrbios das glândulas salivares.....	10
2.5. Xerostomia.....	11
2.5.1. Etiologia da xerostomia.....	11
2.5.1.1. Causas patológicas.....	11
2.5.1.2. Causas iatrogénicas	12
2.5.2. Tratamento oncológico e xerostemia	12
2.6. Tratamento da xerostomia	13
2.7. Saliva artificial.....	14
2.7.1. Composição saliva artificial.....	14

2.7.1.1. Mucinas	15
2.7.1.2. Lactoferrina	16
2.8. Saliva natural vs saliva artificial	16
2.9. Impacto dos componentes da saliva nas vias de inflamação	17
2.9.1. Interleucinas salivares	18
2.10. Vias de sinalização celular na carcinogénese	19
3. TRABALHO EXPERIMENTAL.....	21
3.1. Objetivos.....	21
3.2. Linha celulares.....	21
3.3. Contagem de células	22
3.4. Tratamento com saliva artificial	23
3.5. Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	24
3.6. Ensaio de migração celular	25
3.7. Extração de RNA	25
3.8. Síntese de cDNA.....	25
3.9. PCR em tempo-real quantitativo (QPCR)	26
3.10. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Citotoxicidade da saliva artificial (MTT).....	27
4.2. Migração celular (<i>injury</i>).....	27
4.3. Níveis de expressão génica	28
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÕES	37
7. BIBLIOGRAFIA	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vias de sinalização oncogénicas RAF/MEK/ERK e PI3K/PDK1/AKT lideradas por KRAS no cancro do pâncreas.	20
Figura 2 hTERT-HPNE (linha celular epitelial isolada do pâncreas humano)	22
Figura 3 PANC-1 (linha celular isolada de adenocarcinoma humano).....	22
Figura 4 Saliva artificial ELGYDIUM CLINIC, Xeroleave Spray, Pierre Fabre	23
Figura 5 Viabilidade celular nas linhas celulares hTERT-HPNE e Panc-1, em contacto com diferentes diluições de saliva artificial. Ensaio realizado em triplicado, 24H após o tratamento. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$	27
Figura 6 Migração celular nas linhas celulares hTERT-HPNE e Panc-1, em contacto com diferentes diluições de saliva artificial. Ensaio realizado em triplicado, 24H após o tratamento. ** $p < 0,01$	28
Figura 7 Expressão relativa dos genes EGFR (A), KRAS (B), mTOR (C), PI3K (D) e PTEN (E), nas linhas celular não tumoral (hTERT-HPNE) e tumoral (Panc-1), apos exposição a saliva artificial diluida 32x, em comparação com o controlo negativo (CN). $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$	29

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 Diluições realizadas a partir de saliva artificial concentrada.....	24
Tabela 2 Lista de <i>primers</i>	26

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Micro litro
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca	Cálcio
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
células/ml	Células por Mililitro
Cl	Cloro
CN	Controlo Negativo
CO₂	Dióxido de Carbono
CoQ10	Coenzima Ubiquinona
cSt	Viscosidade Cinemática
DEPC	Dietil-Pirocarbonato
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (do ingles Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBV	Vírus do Herpes Humano 4
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EGFR	Fator de Crescimento Epidérmico
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro Fetal Bovino
Fe³	Ferro
FUC	Fucose
GAL	Galactose

GALNAc	N-acetilgalactosamina
GlcNAc	N-acetilglicosamina
HCV	Vírus Hepatite C
HHV6	Vírus do Herpes Humano 6
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPO	Ácido Fosfórico
HPO3	Carbonato de Hidrogénio
HPV	Papiloma Vírus Humano
HSV	Vírus Herpes Simples
hTERT-HPNE	Linha Celular Epitelial Isolada do Pâncreas Humano
HVA	Hepatite A
HVC	Hepatite C
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL17A	Interleucina 17A
IL-1B	Interleucina 1B
IL-1ra	Recetor Antagonista Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INF-γ	Interferão Gama

kDa	QuiloDalton
KRAS	proteína K-RAS
MB	Meio Basal
Mg	Magnésio
mL	Mililitro
mPas	Viscosidade Dinâmica
MTT	Brometo 3-[4,5-Dimetil-Tiazol-2-il]-2,5- Difeniltetrazólio
MUC7	Mucina 7
MUCB5	Mucina 5B
Na	Sódio
nm	Nanometro
NOD/ShiLtJ	Modelo Poligênico para Diabetes Tipo 1 Autoimune
PANC-1	Linha Celular Isolada de Adenocarcinoma Humano
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGs	Glândulas Parótidas
pH	Potencial de Hidrogénio
PI3K	Fosfoinositide 3-Chinase
PRP	Proteínas Ricas em Prolina
PTEN	Homólogo de Fosfatase e Tensina
Q10	Coenzima Ubiquinol
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Enzima Transcriptase Reversa
RTK	Tirosina-Cinase
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo Inversa

SA	Ácidos Siálicos
SCN	Tiocinato
SLGs	Glândulas Sublinguais
SMGs	Glândulas Submandibulares
SS	Síndrome Sjogren
TH17	Células T Auxiliares 17
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TRP	Potencial Recetor Transitório Vannilóide 1
TRPM8	Potencial Recetor Transitório Melastatina 8
TRPV1	Potencial Recetor Transitório Vannilóide 1
UI/mL	Unidades Internacionais por Mililitro
VZV	Vírus do Herpes 3

1. INTRODUÇÃO

O principal fluido da cavidade oral é a saliva, que corresponde a uma mistura complexa secretada pelas glândulas salivares, nas quais se incluem: parótida, sublingual e submandibular. Na sua composição são encontradas numerosas células e proteínas como, por exemplo, a lactoferrina ou as mucinas (De Almeida et al., 2008; Humphrey & Williamson, 2001).

A saliva possui diferentes propriedades físico-químicas que lhe conferem diversas funções, tais como a fala, a manutenção da saúde oral e o processamento dos alimentos, mas também funções de lubrificação e antimicrobiana (Schipper et al., 2007). Este fluido é muito diluído e é composto por 99,5% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de substâncias inorgânicas. A saliva natural contém vários eletrólitos, incluindo cálcio, magnésio, bicarbonato, fosfato, sódio e potássio.

No geral, os componentes da saliva desempenham diversas funções como a capacidade tampão da saliva e a viscosidade da saliva. Acresce-se, ainda, a função antibacteriana desempenhada pelo cálcio, fosfato e algumas proteínas (Humphrey & Williamson, 2001). Adicionalmente, a saliva tem ainda função de desmineralização e viscoelasticidade (Llena-Puy, 2006).

Deste modo, a redução do fluxo salivar ou alterações na composição oral podem causar desequilíbrios na saúde oral, resultando no aumento da incidência de cáries, maior suscetibilidade à candidíase oral e glossodinia, dificuldades na fala, mastigação e deglutição (Diaz-Arnold & Marek, 2002).

Clinicamente, a sensação de boca seca causada por alterações ou disfunções das glândulas salivares é designada por xerostomia (Tschope et al., 2011). Por sua vez, a hipossalivação pode ser causada por várias síndromes, diabetes *mellitus*, uso de certos medicamentos, infeções ou radioterapia na região das glândulas salivares. Por esta razão, os pacientes com hipossalivação aumentada, geralmente, apresentam maior incidência de cáries, sendo, deste modo, importante o uso de substitutos de saliva, como as salivas artificiais. Tratamentos oncológicos como a radioterapia e quimioterapia, são uma das principais causas de xerostomia, pois afetam a função das glândulas salivares. Além disso, a função salivar continua a diminuir durante os meses subsequentes à terapia, resultando em hipossalivação (Nathan et al., 2023).

Atualmente, ainda não existe um tratamento curativo para a xerostomia. A educação do paciente para hábitos saudáveis, ou a utilização de géis como a saliva artificial, que age como substituto da saliva natural, são alternativas que ajudam a melhorar os sintomas (Diaz-Arnold & Marek, 2002). Existem diferentes tipos de salivas artificiais comercializadas, que diferem, principalmente, na composição química e na viscosidade (Tschoppe et al., 2011). A comunidade científica tem-se debatido sobre este assunto, no entanto, ainda não estão claros os benefícios da utilização de salivas artificiais.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma marca de saliva artificial (Elgydium Clinic, Xeroleave Spray, Pierre Fabre) na viabilidade e motilidade de linhas celulares tumorais (Panc-1) e não tumorais (hTERT-HPNE), e compreender a sua influência na expressão de genes envolvidos nas principais vias de sinalização celular.

As vias de sinalização celular incluem vários fatores que podem alterar ou bloquear um determinado sinal a favor da proliferação celular. Cada via é influenciada tanto por proteínas supressoras, quanto por fatores oncogénicos que promovem o crescimento dos tumores. Em particular, o p53 e o mTOR desempenham um papel crucial na carcinogénese, pois são capazes de regular a proliferação e a sobrevivência das células (Dufour et al., 2007). Muitos tumores, incluindo o cancro do pâncreas, também apresentam mutações oncogénicas no KRAS. Este gene desempenha um papel crucial na proliferação do cancro (von Karstedt et al., 2015). Além disso, o gene KRAS, também está descrito como ativador da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, permitindo a proliferação celular no cancro da mama (Zhang et al., 2020).

A presente dissertação está dividida em três partes principais: enquadramento teórico, trabalho experimental e conclusão.

Na primeira parte, encontra-se um enquadramento teórico sobre o tema, com suporte numa revisão de literatura. Foram utilizadas as plataformas digitais PubMed®, B-On, *ScienceDirect* para a pesquisa bibliográfica, tendo sido utilizadas as palavras-chave: “saliva”, “saliva artificial”, “xerostomia”, “radioterapia” e “interleucinas”.

Na segunda parte, encontram-se estabelecidos os objetivos específicos do trabalho, é realizada uma descrição detalhada da metodologia utilizada e, por fim são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

Finalmente, na terceira parte são apresentadas as principais conclusões deste trabalho.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. Composição da Saliva Natural

As glândulas salivares dividem-se principalmente de acordo com posição e o tipo de secreção. Assim, a glândula parótida é predominantemente serosa, enquanto as glândulas sublingual e submandibular são predominantemente mucosas (De Almeida et al., 2008).

Na composição química da saliva podemos encontrar substâncias inorgânicas tais como: cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), potássio (K), hidrogénio (H), cloro (Cl), carbonato de hidrogénio (HPO_3), ácido fosfórico (HPO) e flúor. De um modo geral, estes iões contribuem para a manutenção osmótica, capacidade tampão e de remineralização da saliva natural (Diaz-Arnold & Marek, 2002).

A saliva contém tanto componentes inorgânicos quanto orgânicos, com uma notável presença de proteínas que desempenham diversas funções essenciais, principalmente na proteção dos tecidos orais. Entre essas proteínas, as mucinas, que são glicoproteínas protetoras, são as mais abundantes. Em quantidades menores, encontramos as proteínas ricas em prolina (PRPs), que estão presentes principalmente na película adquirida, importante para proteger os dentes contra ácidos e microrganismos. Em concentrações ainda mais baixas, estão presentes as histatinas, proteínas cruciais para a remineralização dos dentes, juntamente com as glutininas e lactoferrinas (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).

2.2. Principais funções da saliva

2.2.1. Capacidade tampão

O sistema tampão é definido como um conjunto de reações químicas que permitem manter o pH da saliva quando esta é exposta a substâncias ácidas (Miles et al., 2004). Existem três sistemas tampão importantes na saliva humana: o sistema bicarbonato, o sistema fosfato e o sistema mediado por proteínas (Miles et al., 2004).

Na regulação do pH salivar, o sistema bicarbonato é particularmente importante, pois neutraliza rapidamente os ácidos responsáveis pela diminuição do pH (Miles et al., 2004).

O pH salivar também é regulado pela presença de fosfatos, que são essenciais para

neutralizar os ácidos. Quando o pH é maior que 6, a saliva encontra-se supersaturada de fosfatos. Por outro lado, quando o pH diminui abaixo de 5,5, os cristais de hidroxiapatita libertam fosfato para restabelecer o equilíbrio do pH salivar (Llena-Puy, 2006).

As proteínas, particularmente as ricas em histidina, constituem o terceiro tipo de sistema tampão salivar. Além disso, certos produtos alcalinos, como aminoácidos, peptídeos, proteínas e ureia, também participam na regulação do pH salivar (Llena-Puy, 2006).

2.2.2. Lubrificação/viscoelasticidade

A saliva é uma solução hipotônica, com concentrações de sódio e cloro inferiores às do plasma (Dodds et al., 2005). As mucinas são glicoproteínas salivares de alto peso molecular, que representam a maior parte das proteínas na saliva natural (Miles et al., 2004). Estas glicoproteínas podem ser divididas em dois tipos: MGI/MUC5B e MG2/MUC7. As MUC5B são produzidas pelas células acinares mucosas das glândulas seromucosas, enquanto as MUC7 são sintetizadas pelas células acinares serosas e semilunares das mesmas glândulas (Dodds et al., 2005; Miles et al., 2004). A função de lubrificação da saliva deve-se à presença da Mucina do tipo MUC5B, que com a sua propriedade hidrofílica protege a superfície dentária contra as ações mecânicas. A mucina tem a capacidade de formar uma ponte dissulfeto, fundamental na proteção dos tecidos orais contra bactérias, fungos e ataque de outros microorganismos.

2.2.3. Remineralização dentária

O cálcio é o elemento principal na remineralização dentária, estando presente em grande quantidade na saliva. A combinação de fosfato e cálcio na saliva é, fundamental para o processo de remineralização dos dentes. (Llena-Puy, 2006). Estudos demonstram que a supersaturação da saliva com fosfato e cálcio promove uma melhor restauração dentária durante o desenvolvimento de uma cárie, protegendo o dente da desmineralização e contribuindo para o processo de remineralização, que é ainda mais estimulado pela ação do flúor (Dodds et al., 2005; Llena-Puy, 2006).

O pH salivar e a concentração dos íons cálcio, fosfato e flúor são os principais responsáveis pela regulação do equilíbrio dos cristais de hidroxiapatita. Estes, em conjunto com com PRPs, estaterinas, histainas e cistatinas, inibem a precipitação do

cálcio e do fosfato para manter a integridade dos cristais do esmalte (Llena-Puy, 2006).

2.2.4. Função antimicrobiana

Na cavidade oral encontramos vários tipos de bactérias, sendo que algumas constituem o microbioma oral, enquanto outras podem ser patológicas. A saliva contém proteínas antimicrobianas que atuam perante microrganismos invasores (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).

As proteínas que fazem parte da primeira linha de defesa contra microrganismos invasores da cavidade oral são: lactoperoxidase, lisozima, lactoferrina, mucinas, histatinas, defensinas, imunoglobulina (IgA) e PRPs (Llena-Puy, 2006; Tenovuo, 2002). Cada uma destas proteínas desempenha funções específicas na ação antimicrobiana, embora algumas compartilhem funções similares:

- A lactoperoxidase inativa enzimas glicolíticas bacterianas, inibindo a produção de ácido. Além disso, inibe o transporte de aminoácidos, promove a destruição da parede bacteriana, induz a morte bacteriana por inserção de substrato iodo (I) em vez de SCN (tiocinato) e inibe a adesão bacteriana a cristais de hidroxiapatita (Tenovuo, 2002).
- As lisozimas participam em várias ações antibacterianas, como a lise de paredes de peptidoglicano, autólise bacteriana, inibição da adesão bacteriana às superfícies dentárias, inibição do processo glicolítico bacteriano e desagregação estrutural de cadeias de *Streptococcus* spp (Tenovuo, 2002).
- As lactoferrinas privam as bactérias de ferro (ação bacteriostática), causam a morte bacteriana na ausência de ferro (ação bactericida), inibem a adesão bacteriana às superfícies dentárias e ativam células fagocitárias (Tenovuo, 2002).
- Nas mucinas, as cadeias de hidrato de carbono, que representam 60% do peso molecular da MUC7 e 80% da MUC5B, formam uma barreira que impede a adesão bacteriana às superfícies dentárias (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).
- As histatinas, sintetizadas nas glândulas parótida e submandibular, induzem a morte de um espectro amplo de bactérias, incluindo *Streptococcus mutans* (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).
- As imunoglobulinas salivares, principalmente IgA (>85%) e uma pequena

quantidade de IgG, inibem a adesão bacteriana e a sua colonização (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).

- As glicoproteínas ricas em prolina (PRPs), provenientes da glândula parótida, bloqueiam a formação de placa bacteriana (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).

2.2.5. Vírus e fungos

Na saliva é possível encontrar uma grande variedade de vírus, tal como: Herpes-vírus simples (HSV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus varicela-zóster (VZV), vírus de Epstein-Barr (EBV), vírus do papiloma humano (HPV), hepatites A e C (HVA e HVC), ébola, HHV6 e 8, adenovírus, vírus de Norwalk, sarampo (Van Nieuw Amerongen et al., 2004).

Segundo Stefano (2020) os principais vírus da cavidade oral são papiloma virus humano (HPV) o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A presença desses vírus compromete a saúde oral, resultando num aumento de cáries e doenças periodontais. (Stefano, 2020). Em relação aos fungos, o agente patogénico mais prevalente na cavidade oral é a *Candida albicans* (Janus et al., 2016).

De acordo com Malamud et al. (2011), a saliva também possui uma atividade antivírica, proteínas como as lactoferrinas, as lisozimas, as mucinas, as peroxidases e as aglutininas, acumulam à atividade antibacteriana, atividade antivírica. No entanto, é importante salientar que a atividade antivírica das proteínas é limitada (Malamud et al., 2011).

2.2.6. Paladar

Os recetores gustativos estão localizados nas papilas gustativas, principalmente na mucosa oral, embora também possam ser encontrados na mucosa faríngea, laríngea e na epiglote (Malamud et al., 2011).

A saliva desempenha um papel fundamental no transporte das substâncias responsáveis pelo sabor, além de proteger os recetores gustativos. A saliva afeta o paladar através das interações químicas com as substâncias gustativas, estimulando e protegendo os recetores (Malamud et al., 2011).

Os componentes orgânicos e inorgânicos da saliva são essenciais na mediação do paladar.

A água, com o contributo das mucinas, é o principal componente salivar responsável por manter a sensibilidade do paladar, protegendo os recetores gustativos contra os danos causados pela sensação de boca seca (xerostomia). Adicionalmente, alguns componentes específicos da saliva interagem quimicamente com substâncias gustativas antes de estas chegarem aos seus locais de ligação nos recetores. Por exemplo, sabe-se que a saliva, normalmente, diminui a intensidade do sabor azedo. A percepção do sabor ácido depende da concentração de iões de hidrogénio e da presença de aniões ou moléculas ácidas dissociadas. Ademais, a disponibilidade de iões salivares de sódio (Na) e cloro (Cl) afeta a percepção do sabor salgado do cloreto de sódio (Motsuo, 2000).

2.2.7. Digestão e formação do bolo alimentar

A saliva tem função também no sistema de digestão, uma vez que é o primeiro fluido do nosso corpo que entra em contacto com a comida (Miles et al., 2004; Van Nieuw Amerongen et al., 2004). Por isso encontramos na saliva proteínas como: DNAase, amilase salivar, lipase, ribonuclease, protease e mucinas, que reduzem cadeias de macromoléculas em cadeias mais simples (Miles et al., 2004).

De todas as enzimas referidas anteriormente a mais abundante é a amilase salivar. A maior parte destas proteínas são sintetizadas nas células serosas da glândula parótida (80%) e em menor número nas células serosas da glândula submandibular. As amilases são responsáveis pela hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 existentes nas moléculas de amido e outros hidratos de carbono, tal como o glicogénio. Neste processo, o amido é transformado em maltose, maltotriose e dextrinas. Para finalizar, as lipases provocam a desagregação molecular dos triglicéridos e são libertadas na saliva pelas células serosas das glândulas parótida e de Von Ebner (De Almeida et al., 2008; Miles et al., 2004).

Nos humanos, a mastigação induz a secreção salivar através da ativação de mecanorreceptores localizados no ligamento periodontal e propriocetores e/ou nociceptores na mucosa oral (Dawes et al., 2015).

2.3. Funções da saliva não correlacionadas com moléculas específicas

2.3.1. Humidade

Uma das principais funções das glândulas salivares é fornecer um fluxo contínuo de saliva

na cavidade oral para manter a mucosa humedecida, protegendo da abrasão e facilitando a eliminação de microrganismos externos ao microbioma da mucosa oral (Dawes et al., 2015).

2.3.2. Odor

O odor estimula a secreção de saliva pelas glândulas submandibulares (SMGs) e sublinguais (SLGs), mas não estimula as glândulas parótidas (PGs). A taxa de secreção salivar aumenta em resposta a alimentos ou odores relacionados ao sabor. Diferentes odores relacionados ao sabor (doce, salgado e azedo) e odores relacionados a macronutrientes (carboidratos, proteínas, gorduras e compostos de baixa caloria) induzem um aumento semelhante na taxa de secreção salivar, porém, não afetam a viscosidade, elasticidade, nem a atividade da α -amílase e lípase lingual. Esta combinação de estímulos é essencial para aumentar a taxa de fluxo e a atividade das enzimas salivares, facilitando a digestão (Morquecho-Campos et al., 2019).

Os dados do proteoma salivar humano indicam que os estímulos mecânicos e gustativos não alteram a concentração total de proteínas, mas aumentam o seu volume e a quantidade total. Salienta-se, ainda, que os estímulos de mastigação e gustativos podem ativar tanto o sistema nervoso parassimpático quanto o sistema nervoso simpático. Estes estímulos co regulam os componentes e as concentrações de proteínas nas glândulas salivares humanas (Carreira et al., 2020).

A eficiência da deglutição tem uma correlação positiva com o volume de matéria cinzenta cerebral, no entanto, existe uma correlação negativa com a idade em idosos saudáveis (52-82 anos, 28 mulheres) (Lin et al., 2019).

2.3.3. Sabor

Os sinais de reconhecimento dos sabores pelas papilas gustativas na boca, faringe e laringe são transmitidos pelos nervos faciais, glossofaríngeos e vagos, que terminam no núcleo do trato solitário no tronco cerebral (Vincis & Fontanini, 2019). Morquecho-Campos et al. (2019) utilizaram pistas multissensoriais - odor, odor + visão, odor + visão + sabor e odor + visão + gosto + mastigação – com o objetivo de testar a resposta de secreção da saliva. Os estímulos multissensoriais resultam em mudanças significativas na

taxa de secreção salivar e nos seus componentes, dependendo de acordo com as combinações das modalidades sensoriais testadas (Morquecho-Campos et al., 2019).

Os canais iônicos do recetor de potencial transitório (TRP) presentes nas células epiteliais orais respondem a mudanças de temperatura, agentes irritantes (como capsaicina) e agentes frios (como mentol). A capsaicina (um agonista TRPV1) também induz uma maior taxa de secreção de IgA, com aumento da onda β e da variabilidade da frequência cardíaca no eletroencefalograma; o TRPV1 aumenta a taxa de secreção de IgA através do sistema nervoso simpático (Houghton et al., 2020).

No estudo de Houghton et al. (2020) foi demonstrado que os agonistas TRPV1 e os agonistas TRPM8 também alteram os componentes da saliva e aumentam a produção de proteínas na saliva em toda a cavidade oral. Além disso, os agonistas TRPV1 induzem uma resposta salivar aguda da cistatina S, melhorando a adesão da mucosa. O agonista TRPV1 cinamaldeído é mais eficaz do que o mentol, mas não pode induzir a secreção de saliva, o que sugere que as respostas salivares são específicas para os agonistas TRP (Houghton et al., 2020).

2.3.4. Clearance

As diferenças existentes nas taxas de remoção salivar de hidratos de carbono provenientes dos alimentos, substâncias ácidas, microrganismos e agentes terapêuticos (por exemplo, flúor) ajudam a explicar as variações na suscetibilidade a doenças entre indivíduos e em diferentes áreas dentro da própria cavidade oral (Gao et al., 2016).

A cavidade oral é porta de entrada, diariamente, para uma grande variedade de substâncias, algumas das quais, como a sacarose ou ácidos, representam uma ameaça à saúde oral. Outras substâncias, tal como o flúor, podem atuar como agentes de defesa, promovendo a higiene oral (Gao et al., 2016).

A saliva produzida, associada ao processo de deglutição, reduz a concentração de substâncias exógenas. Assim, a rápida remoção salivar de substâncias prejudiciais é benéfica para a saúde oral, no entanto, o mesmo acontece com substâncias protetoras (Andrea 2022).

Entre os vários modelos para explicar o mecanismo de remoção salivar, o mais amplamente utilizado é o modelo de Dawes, no qual o processo de deglutição é

comparado à ação constante de um sifão invertido, que descreve com grande precisão a remoção de substâncias, incluindo a sacarose, que não se ligam às superfícies orais. Outros estudos indicaram que a remoção pode ocorrer em dois estádios: um rápido através do fluxo salivar e um mais lento através das áreas de estagnação (Andrea, 2022).

2.4. Disfunção e distúrbios das glândulas salivares

As doenças sistêmicas, como as infecções, os distúrbios inflamatórios, as doenças genéticas e as neoplasias, afetam a função das estruturas presentes na cavidade oral (Holmstrup et al., 2018; Ogle, 2020). A hipossalivação corresponde à redução da secreção salivar, enquanto a xerostomia é a sensação de boca seca associada à hipossalivação (Kinane et al., 2017).

A síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune bastante documentada, na qual as glândulas exócrinas são afetadas principalmente pelo ressecamento oral, sendo a epitelite autoimune a sua principal causa. As células epiteliais desempenham um papel central na regulação das respostas autoimunes através da apresentação de antígenos. A acumulação de células imunitárias regula a resposta imune local e estimula ainda mais as células epiteliais, resultando num ciclo de interação entre estes dois tipos celulares. O epitélio das glândulas salivares é prejudicado pela infiltração anormal de células B e T, e a inflamação crónica secundária leva à perda de funções fisiológicas do epitélio (Brito-Zerón et al., 2016).

As células Th17, que expressam IL-17 e o recetor de quimiocina $9+/\alpha4\beta7-$, promovem a inflamação, disfunção e morte celular nas glândulas salivares de ratos NOD/ShiLtJ e em pacientes com SS. Nestes últimos, observam-se níveis séricos elevados de IgA e IL-17, associados a níveis mais baixos de ácido retinóico, além do aumento de células duplamente positivas para o recetor de quimiocina 9 e IL-17 em biópsias das glândulas salivares (Hwang et al., 2021). De acordo com Erbasan et al. (2016) a leptina aumenta as funções fagocíticas e induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a secreção de TNF- α e IL-2, o que evidencia a sua função na proteção contra infecções, no entanto, a sua função pró-inflamatória aumenta o risco de doenças autoimunes (Erbasan et al., 2016).

Em pacientes com psoríase em placas, uma doença crónica relacionada ao sistema imunológico, observa-se perda na função secretora das glândulas parótidas e

submandibulares, redução na atividade da amilase salivar e na concentração total de proteínas na saliva, além de níveis mais elevados de TNF- α , IL-2 e INF- γ e mais baixos de IL-10 (Skutnik-Radziszewska et al., 2020). O estado oxidante total salivar e o índice de estado oxidativo podem ser biomarcadores com potencial de diagnóstico para a psoríase em placas (Skutnik-radziszewska et al., 2020).

2.5. Xerostomia

De acordo com Decani et al. (2012) a xerostomia afeta cerca de 1 a 29% da população, principalmente mulheres. Esta patologia também pode ser observada em pacientes geriátricos e em indivíduos que fazem uso de certos medicamentos, bem como indivíduos submetidos a radioterapia da região da cabeça e pescoço ou afetados por condições autoimunes, como foi referido anteriormente (Decani et al., 2012).

Os principais sinais de xerostomia incluem a sensação de boca seca, problemas na ingestão de alimentos e ressecamento da mucosa oral e da pele. A avaliação desta condição é baseada em entrevistas estruturadas e avaliação do volume salivar não estimulado e estimulado. A xerostomia não tratada prejudica a qualidade de vida, podendo em alguns casos, levar a depressão (Decani et al., 2012).

2.5.1. Etiologia da xerostomia

A Xerostomia é uma sensação de boca seca, que pode ser acompanhada por sinais de hipossalivação. Esta condição pode estar associada a diferentes causas: patológicas, iatrogénicas, psicológicas, entre outras (Decani et al., 2012).

2.5.1.1. Causas patológicas

A causa patológica mais comum é a síndrome de Sjögren, que é uma doença inflamatória crónica, caracterizada principalmente por uma infiltração linfocitária focal nas glândulas exócrinas (Lavoie et al., 2013). Esta síndrome pode ocorrer por via primária ou secundária. A via primária pode apresentar-se como xerostomia e xerofthalmia, e a secundária, por sua vez, apresenta-se como uma doença autoimune (Carda et al., 2006).

O lúpus eritematoso sistémico também pode estar associado à presença de xerostomia.

Esta patologia consiste na formação de imunocomplexos solúveis, compostos sobretudo por imunoglobulinas IgG e IgM a nível renal, pulmonar e articular.

Nos pacientes com diabetes *mellitus* tipos 1 e 2, também está descrita uma percentagem de casos com xerostomia. Foi efetuado um estudo onde foi encontrada uma variação no conteúdo da saliva, em particular em paciente com diabete de tipo 1. As alterações neurológicas e da microcirculação, características do paciente diabético, podem estar na origem da variação do fluxo e da composição salivar (Moore et al., 2001).

Por fim, existem também outras patologias associadas com a xerostomia: esclerodermia, infeção por HIV, artrite reumatoide, vírus hepatite C (HCV), cirrose, fibrose cística, sarcoidose, doença de Parkinson, aplasia, e vírus linfócitos T (Decani et al., 2012).

2.5.1.2. Causas iatrogénicas

O tratamento com fármacos, a radioterapia e a quimioterapia são as principais causas da xerostomia. A maior parte dos fármacos apresenta a xerostomia como efeito adverso, particularmente em pacientes idosos. Existem inúmeros grupos farmacológicos responsáveis pelo aparecimento de xerostomia, mas os anticolinérgicos parecem ser o grupo farmacológico mais frequentemente associado a esta patologia, uma vez que a maior parte dos fármacos anticolinérgicos não tem seletividade para os recetores, podendo afetar os recetores da secreção salivar (Decani et al., 2012).

Os tumores de cabeça e pescoço podem ser tratados com a administração da radioterapia e quimioterapia, sendo a xerostomia um dos efeitos adversos mais comuns. No caso da radioterapia, a redução do fluxo salivar é uma consequência da destruição direta pela radiação ionizante dos tecidos glandulares. Esse dano ocorre principalmente devido à localização superficial das glândulas salivares, que se encontram acima da massa neoplásica durante a irradiação. Além disso, durante a quimioterapia, a presença de mucosite está particularmente associada à redução da produção salivar.(Decani et al., 2012).

2.5.2. Tratamento oncológico e xerostemia

Segundo Nathan et al. (2023) aproximadamente 80% dos pacientes que estão a realizar radioterapia para tratamento de tumores na cabeça e pescoço apresentam sintomas de

xerostomia. A sensação subjetiva de boca seca resulta da redução da saliva não estimulada pelas glândulas submandibulares. Ademais, as glândulas salivares menores produzem até 70% da mucina total secretada (Nathan et al., 2023).

Durante a primeira semana de radioterapia, ocorre uma diminuição do fluxo salivar de 50% a 60%. Após 7 semanas de radioterapia convencional, o fluxo salivar das glândulas afetadas diminui cerca de 20%. A função salivar continua a diminuir até vários meses após a radioterapia. Embora ocorra alguma regeneração após o tratamento, em certa medida, a xerostomia acaba por se tornar crônica e permanece um desafio significativo para a maioria dos sobreviventes de cancro de cabeça e pescoço. A qualidade de vida nestes pacientes piora devido à produção de saliva deficitária e, conseqüentemente, ocorre redução da capacidade gustativa e mastigação desconfortável e/ou dolorosa (Nathan et al., 2023).

A redução do fluxo salivar nos sobreviventes de cancro na cabeça e pescoço também aumenta o risco de cárie dentária e fissuras na mucosa. Além da redução da qualidade de vida, os pacientes com xerostomia induzida por radiação também podem deparar-se com encargos económicos significativos devido à necessidade de tratamentos orais e odontológicos e, possivelmente, colocação de próteses ou implantes, que são despesas substanciais na maioria dos países (Jha et al., 2012).

Portanto, dada a importância do problema, foi realizada uma investigação clínica sobre estratégias para reduzir a xerostomia em pacientes com HNC. Foram estudadas várias medidas para prevenção e tratamento da xerostomia. Estas incluem medicamentos, como pilocarpina, amifostina, estratégias não farmacológicas como acupuntura, estimulação neural, oxigenoterapia hiperbárica e opções cirúrgicas, como o transplante de glândulas salivares (Nathan et al., 2023).

2.6. Tratamento da xerostomia

O tratamento da xerostomia é complicado na medida em que têm de se tratar várias fontes. Além da terapia para estimulação do fluxo salivar, é muito importante educar o paciente para a modificação de hábitos como o consumo de açúcares e bebidas com gás. Também o consumo de tabaco e cannabis têm influência negativa sobre o fluxo salivar (Diaz-Arnold & Marek, 2002). O tratamento da xerostomia tem como objetivo o controlo da sintomatologia, a saliva artificial, por exemplo, é útil no tratamento da hipossalivação,

embora não aumentem a produção de fluxo salivar (Napeñas et al., 2009). Por consequência, independentemente das causas, o tratamento da xerostomia não é definitivo, além dos efeitos secundários inerentes à utilização destes fármacos (Riley et al., 2017).

Por outro lado, o benefício dos tratamentos tópicos, substitutos salivares, de formulação química, por vezes com adição de mucinas animais, parece limitado (Furness et al., 2013). Recentemente, a utilização da coenzima Q10 (CoQ10), demonstrou melhorar a sintomatologia da boca seca nos pacientes com síndrome de Sjögren (Ushikoshi-Nakayama et al., 2019). Esta coenzima é essencial na cadeia energética de ATP, na mitocôndria, é fundamental para a contração muscular e possui um elevado poder antioxidante (Crane, 2001; Turunen et al., 2004). A administração de substâncias antagonistas do stresse oxidativo, tais como as vitaminas E e C, promove o aumento direto e indireto dos níveis da coenzima CoQ10, demonstrando ser um tratamento potencialmente eficaz na regressão da xerostomia (Ushikoshi-Nakayama et al., 2019).

2.7. Saliva artificial

O principal medicamento na atenuação da xerostomia é a saliva artificial, que permite uma melhoria na qualidade de vida do paciente, prevenindo algumas complicações orais, na ausência ou diminuição da produção de saliva (Łysik et al., 2019).

A saliva artificial com a capacidade de humidificar a cavidade oral comprova ser muito útil na redução dos sintomas da xerostomia. Por isso, os equivalentes da saliva constituem uma importante função na manutenção oral. A prevenção do aparecimento e desenvolvimento da erosão dentária é uma das principais funções da saliva artificial (Smith et al., 2001).

2.7.1. Composição saliva artificial

Um dos principais componentes da saliva artificial é a água, associada a sais minerais (que encontramos na cavidade oral) como fosfato e cálcio. Uma das funções do cálcio e do fosfato é a regulação do pH, importante no equilíbrio entre desmineralização e remineralização dentária (Silvestre et al., 2009).

Atualmente, podemos encontrar comercializadas, mais do que um tipo de saliva,

principalmente constituídas com mucinas de origem animal, concedendo-lhes uma viscosidade muito semelhante à saliva natural (Alpöz et al., 2008; Diaz-Arnold & Marek, 2002). Uma alternativa à mucina é um derivado da carbometilcelulose, mas muitos estudos afirmam que a mucina tem uma função de lubrificação e hidratação maior (Alves et al., 2004; Preetha & Banerjee, 2005).

A função antimicrobiana é uma das principais funções da saliva natural, por isso foi imprescindível adicionar à saliva artificial enzimas como: lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima, juntamente com os seus substratos (peróxido de hidrogênio e tiocianato.). Em conjunto, estas enzimas formam a primeira defesa significativa contra bactérias.

A lisozima e lactoferrina são as principais enzimas que encontramos nas salivas artificial comerciais, como Biotène, BioXtra e Zedium, sendo ambas as enzimas extraídas do colostro bovino. A lactoperoxidase é outra enzima encontrada comumente nas salivas comerciais. São utilizadas estas enzimas de origem animal, uma vez que são mais semelhantes às enzimas humanas presentes na saliva natural (Tenovuo, 2002).

Além disso, de forma a ser mais agradável a utilização pelos pacientes são utilizados açúcares como xilitol ou sorbitol (Diaz-Arnold & Marek, 2002). Por outro lado, algumas marcas de saliva artificial contêm lima na sua composição, o que pode ser causa de erosão na cavidade oral (Alpöz et al., 2008). De modo a manter a regulação do pH que promove a mineralização dentária contra a demineralização causada por hipossalivação, é crucial incluir cálcio e fosfato na fórmula das salivas artificiais (Alpöz et al., 2008; Tschoppe et al., 2011).

Foglio-Bonda et al. (2022) analisaram doze soluções de saliva artificial líquida comercialmente disponíveis. Analisaram a viscosidade cinemática (cSt), a viscosidade dinâmica (mPas), o pH à temperatura ambiente, e a fibrosidade (de Spinnbarkeit). Foi observada uma correlação quase linear entre viscosidade cinemática e Spinnbarkeit dos substitutos de saliva avaliados, tornando muito difícil realizar saliva de forma artificial, dado a composição química e física únicas e complexas da saliva natural (Foglio-Bonda et al., 2022).

2.7.1.1. Mucinas

As mucinas são glicoproteínas de peso molecular elevado, com uma estrutura longa que contribuem significativamente para o comportamento viscoelástico da saliva. Estas possuem uma estrutura comum que inclui um núcleo peptídico (apomucina) enriquecido

com resíduos de serina, treonina e prolina, e cadeias laterais de hidratos de carbono (oligosacarídeos ou glicanos) que são ligadas através de uma ligação O-glicosídica à treonina ou serina. Os O-glicanos das mucinas salivares humanas podem conter galactose (Gal), fucose (Fuc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácidos siálicos (SA) (Andrea, 2022).

Estudos das mucinas produzidas pelas glândulas submandibulares em diferentes espécies têm consistentemente indicado a presença de dois tipos de mucinas, uma de peso molecular mais baixo (aproximadamente 250 kDa), MUC7, anteriormente conhecida como MUC2, composta por uma única subunidade com cerca de 170 glicanos, não formando gel e uma de peso molecular mais alto (aproximadamente 1×10^6 kDa), a MUC5B, anteriormente conhecida como MG1, composta por múltiplas subunidades com cerca de 300 glicanos no total, formando gel (Andrea, 2022).

2.7.1.2. Lactoferrina

Segundo Dawes (2012) a lactoferrina, com peso molecular de 80 kDa, é uma glicoproteína não enzimática produzida pelas glândulas salivares maiores e menores. Os leucócitos na cavidade oral também têm a capacidade de libertar lactoferrina na saliva. A sua atividade biológica é atribuída à alta afinidade pelo ferro (Fe^{3+} ; com dois sítios de ligação), captando o ferro necessário ao crescimento de microrganismos patogénicos. Além, disso na forma sem ferro (apo-lactoferrina), apresenta um efeito bactericida irreversível em várias bactérias orais, através da ligação direta da apo-lactoferrina às bactérias. Além disso, fragmentos peptídicos derivados da lactoferrina inibem a adesão do *Streptococcus mutans* à hidroxiapatita. Durante a digestão, é provável que os domínios de lactoferrina, com atividade antimicrobiana, derivados da lactoferrina sejam libertados no trato gastrointestinal, o que é sugestivo do papel das proteínas salivares na proteção do trato gastrointestinal superior. Além das propriedades bacteriostáticas e bactericidas, a lactoferrina também demonstra atividade fungicida, antiviral e anti-inflamatória (Dawes, 2012).

2.8. Saliva natural vs saliva artificial

A saliva não possui apenas função de lubrificação, mas exercita numerosas funções como a manutenção e proteção da mucosa e controlo da remineralização dentária. Considerando

a natureza complexa da saliva natural, a sua produção em laboratório é difícil de realizar (Preetha & Banerjee, 2005).

A saliva artificial necessita de ter as seguintes características: uma longa duração, capacidade de lubrificar tecidos moles com conseguinte proteção contra ações mecânicas e químicas, impedir o crescimento bacteriano na cavidade oral. No entanto, ainda não foi constituída uma saliva artificial com todas estas funções (Diaz-Arnold & Marek, 2002).

Um estudo realizado em 2005, analisou como as salivas artificiais (Saliveze e Xialine) tem uma tensão superficial (5 nm) superior à tensão da saliva natural. Este é um importante aspeto negativo para as salivas artificiais, uma vez que para ter uma lubrificação ideal a tensão superficial tem de ser menor, com uma tensão assim alta a saliva não pode lubrificar e fazer uma dispersão uniforme na cavidade oral (Preetha & Banerjee, 2005).

Outras desvantagens da saliva artificial, são a curta duração e o sabor pouco agradável. Muitos pacientes reatam vômitos e náuseas, após a utilização de algumas salivas artificiais. Um estudo observou que algumas salivas com pH baixo e sem flúor contribuem significativamente para a desmineralização dentária (Loo et al., 2010; Tenovuo, 2002). O custo elevado associado à utilização de salivas artificiais é também uma desvantagem significativa, uma vez que a maioria dos pacientes com xerostomia não tem capacidade económica (Alves et al., 2004).

2.9. Impacto dos componentes da saliva nas vias de inflamação

A saliva contém diversas proteínas importantes para o desenvolvimento dos processos de inflamação e na sua prevenção. A relação entre infeções orais e inflamação e o fluxo de determinadas proteínas, é um aspeto fundamental do fluxo salivar. O trabalho laboratorial realizado por Orzechowska-Wylęgała et al. (2024), com o objetivo de compreender de que forma as citocinas presentes na saliva podem ser biomarcadores de infeções odontogénicas orais e faciais em crianças, permitiu concluir que a interleucina-10 (IL-10), a interleucina-17 (IL-17) e eotaxina podem ser utilizadas como potenciais biomarcadores para a inflamação oral em crianças (Orzechowska-Wylęgała et al., 2024).

Num outro estudo, realizado pela professora Miller (2021), foi demonstrada a viabilidade da avaliação de interleucina-1B (IL-1B) e do recetor antagonista da interleucina-1 (IL-1ra) em amostras salivares de crianças, como representativas de processos pró e anti-

inflamatórios. Os autores concluíram que a IL-1B e IL-1ra são biomarcadores úteis na função imunológica em recém-nascidos (Miller, 2021).

Segundo Cvikl et al. (2015) a saliva estéril pode provocar uma resposta inflamatória aumentada em fibroblastos orais envolvendo a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogénio (Cvikl et al., 2015).

Müller et al. (2016) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar de que forma a saliva artificial pode contribuir para a cicatrização de feridas orais. O estudo não confirmou se a saliva artificial modifica a cicatrização de ferida orais, mas demonstrou que a saliva artificial (Orthana) aumenta a expressão de interleucinas, como a IL-8. No entanto, o mecanismo responsável pela resposta celular da saliva artificial ainda não é claro (Müller et al., 2016).

Ainda, segundo Malpass et al. (2013), a saliva artificial altera a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, demonstrando que α -amílase é responsável por esta resposta inflamatória (Malpass et al., 2013)

Adicionalmente, a interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória com papel importante em vários mecanismos reguladores de carcinogénese, demonstrou valores de expressão elevados na saliva, em pacientes com tumores de cabeça e pescoço, estando relacionada ao desenvolvimento de tumores e à respetiva baixa sobrevida (Uz & Eskiizmir, 2021).

2.9.1. Interleucinas salivares

As citocinas constituem um meio de comunicação do sistema imunitário e são libertadas quando estimulada a sua produção. A sua concentração na saliva é importante para determinar o estado de inflamação (De Simone et al., 2015). As citocinas mais frequentemente encontradas na saliva são:

- **TNF α (Tumor Necrosis Factor Alfa):** relacionada com a inflamação sistémica, mais envolvidas nas articulações e mucosa intestinal (De Simone et al., 2015).
- **IL 1 (Interleukin1 alfa e beta):** Defesa do organismo contra as infeções da natureza bacteriana (Buckley et al., 2018).
- **IL2 (Interleukin 2):** Importante ação antiviral, estimuladora da melatonina (Yuan et al., 2022).

- **IL4 (Interleukin 4):** Estimula a produção de anticorpos IgE, importante em infecções parasitárias (Iwaszko et al., 2021).
- **IL6 (Interleukin 6):** Citocina inflamatória, que pode estar envolvida no aumento de peso (De Simone et al., 2015).
- **IL8 (Interleukin 8):** Sinalização inflamatória, envolvida no recrutamento dos neutrófilos e na ativação dos neutrófilos durante a resposta inflamatória.
- **IL17a (interleukin 17):** Uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por células T *helper* tipo 17. Desempenha um papel vital na regulação da resposta do sistema imunitário contra vários agentes patogênicos, incluindo vírus (Sahu et al., 2021).

2.10. Vias de sinalização celular na carcinogênese

A ativação do fator de crescimento epidérmico (EGFR), resulta na ativação de vias de sinalização celulares subsequentes, envolvidas na promoção da proliferação celular e resistência à apoptose, tornando-o um excelente alvo de estudo no contexto de carcinogênese. A ativação do EGFR pelo EGF leva à progressão do ciclo celular de G1 para S através das vias de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK e PI3K-AKT-mTOR (Wee P., et al.,2017).

Na via RAS-RAF-MEK-ERK, o RAS ativado recruta e ativa o RAF-1, desencadeando a ativação sequencial de MEK1/2 e ERK1/2, promovendo respostas celulares diversas, incluindo crescimento e proliferação das células (Wee P., et al.,2017).

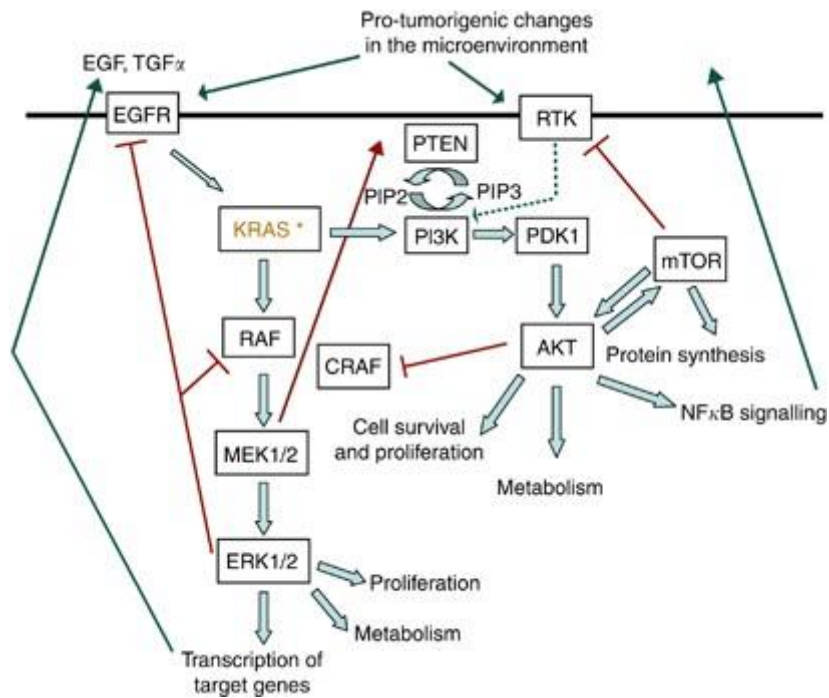
Na via PI3K-AKT-mTOR, o PI3K ativa a AKT, que fosforila várias proteínas, promovendo a sobrevivência celular e crescimento, além de ativar o mTOR, que regula a síntese proteica e o crescimento celular. A via PI3K-AKT-mTOR é essencial na regulação do metabolismo celular, encontrando-se frequentemente hiperativada em cancro, sendo um alvo importante para terapias (Wee P., et al.,2017).

Na Figura 1 estão representadas as vias de sinalização oncogénicas RAF/MEK/ERK e PI3K/PDK1/AKT lideradas por KRAS no cancro do pâncreas. A ativação oncogénica do KRAS por mutação, ativa a via PI3K-PDK1-AKT para impulsionar o início, a progressão e a manutenção do cancro. Além disso, o KRAS ativado sinaliza por meio da via canónica da proteína quinase ativada por mitogénio a via RAF-MEK1/2-ERK1/2. A atividade do

KRAS é amplificada pela ativação com *feedback* positivo do EGFR e, possivelmente, por outros recetores de tirosina-cinase (RTK) ativadas por estímulos autócrinos e parácrinos. Existem circuitos de *feedback* negativo e sinalização cruzada inibitória e ativadora em diversos níveis, resumidos na Figura 1 (Eser et al., 2014).

Figura 1

Vias de sinalização oncogénicas RAF/MEK/ERK e PI3K/PDK1/AKT lideradas por KRAS no cancro do pâncreas.



A sinalização pró-tumorigénica está representada pelas setas verdes; as vias anti-tumorais inibitórias estão demonstradas como linhas contínuas seguidas por uma linha vertical em vermelho. As setas vermelhas indicam a ativação dos circuitos de *feedback* anti-tumoral. O asterisco (KRAS*) representa a ativação mutacional do KRAS Adaptado de (Eser et al., 2014).

3. TRABALHO EXPERIMENTAL

3.1. Objetivos

A Xerostomia é uma sensação de boca seca que pode ser acompanhada de sinais de hipossalivação. Esta pode ocorrer diretamente devido a uma patologia, no entanto, muitas vezes, resulta do tratamento com fármacos, radioterapia ou quimioterapia (Napeñas et al., 2009). A saliva artificial é comumente utilizada no tratamento da xerostomia, no entanto, este torna-se extremamente difícil, uma vez que a saliva natural possui uma mistura complexa, difícil de replicar artificialmente (Preetha & Banerjee, 2005). Vários estudos têm demonstrado que a resposta celular à saliva é complexa, envolvendo alteração na expressão de genes envolvidos em vias de sinalização de inflamação, proliferação e sobrevivência celular. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de uma marca de saliva artificial (Elgydium Clinic, Xeroleave Spray, Pierre Fabre) na viabilidade e migração de uma linha celular tumoral (Panc-1) e uma não tumoral (hTERT-HPNE), e compreender a sua influência na expressão de genes envolvidos nas principais vias de sinalização celular. Para atingir os objetivos propostos, realizaram-se ensaios de viabilidade, pelo método de MTT (brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio), a migração foi avaliada pelo método de *Injury*, tendo-se procedido à extração de RNA para posterior avaliação da expressão génica por RT-qPCR.

3.2. Linha celulares

As linhas celulares selecionadas foram a hTERT-HPNE (linha celular epitelial isolada do pâncreas humano) (Figura 2) e a PANC-1 (linha celular isolada de adenocarcinoma humano) (Figura 3). Ambas as linhas celulares foram cultivadas em meio basal (MB), que é constituído por meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e penicilina (10 UI/mL). As células foram sempre mantidas numa atmosfera húmida a 37°C e 5% de CO₂. Após a cultura das células, foram realizados ensaios de citotoxicidade (MTT), migração celular (*Injury*) e expressão génica (RT-qPCR).

Figura 2

hTERT-HPNE (linha celular epitelial isolada do pâncreas humano)

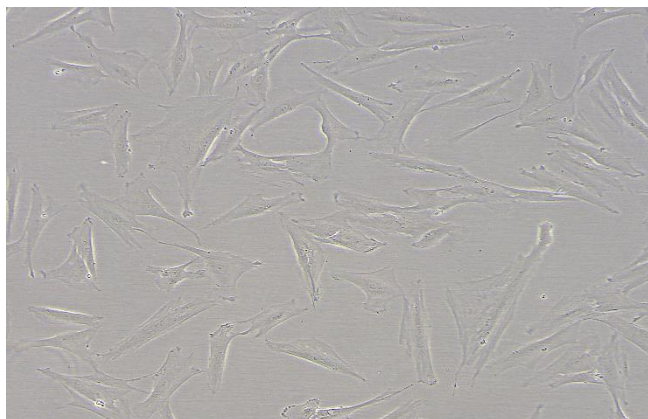
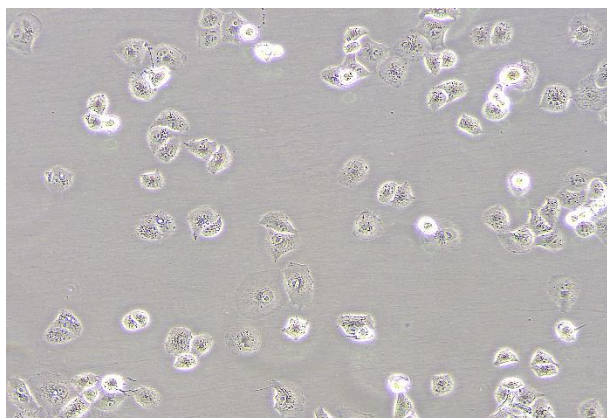


Figura 3

PANC-1 (linha celular isolada de adenocarcinoma humano)



3.3. Contagem de células

As células foram mantidas em cultura e subcultivadas, até ter o número de células necessárias à realização dos ensaios. Primeiramente, foi necessário remover o meio de cultura da placa, lavando-se as células delicadamente com PBS (*phosphate buffered saline*) 0,01 M estéril. Posteriormente, adicionou-se 1mL de solução de Tripsina-EDTA 0,25% (*Thermo Fisher*), incubando na estufa a 37°C e 5% CO₂ durante aproximadamente 5 minutos para promover a liberação das células. De seguida, a solução de Tripsina foi neutralizada com a adição de 1 mL de meio DMEM + FBS. As células foram homogeneizadas gentilmente e foi utilizado 10 µL da suspensão total para a contagem. Para tal, adicionou-se a este volume 10 µL de azul de tripano (*Synth*) e a mistura foi depositada gentilmente sob uma Camara de Neubauer para contagem.

Para calcular o número de células, foi aplicada a seguinte fórmula:

N° de células/mL = N° total de células contadas / N° de quadrantes contados X Fator de diluição X 10.000, sendo que o fator de diluição é igual a 2.

Para o ensaio MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços com uma concentração de 1×10^5 células/mL. Já para o ensaio de migração as células foram semeadas em placas de 6 poços com uma concentração de 5×10^5 células/ml. A extração de RNA foi efetuada a partir das placas de 6 poços usadas no ensaio de migração celular. Após semeadas nas placas de ensaio, as células permaneceram em cultura durante 24 horas em meio DMEM +10% FBS.

3.4. Tratamento com saliva artificial

Os ensaios foram realizados com a saliva artificial Elgydium Clinic, Xeroleave Spray, Pierre Fabre (Figura 4), tendo sido efetuadas 8 diluições, em meio de cultura (DMEM) sem FBS, que se encontram resumidas na Tabela 1. Foram aplicados os mesmos tratamentos nas linhas tumoral e não tumoral. Meio DMEM sem FBS foi utilizado como controlo negativo (CN) do ensaio.

Figura 4

Saliva artificial *ELGYDIUM CLINIC*, Xeroleave Spray, Pierre Fabre



Tabela 1

Diluições realizadas a partir de saliva artificial concentrada.

Diluição	Volume (μL)	Meio Basal sem FBS (μL)
10x	300 (Solução concentrada)	1700
2x	2000 (Solução concentrada)	2000
4x	4000 (Solução Diluída 2x)	4000
8x	4000 (Solução Diluída 4x)	4000
16x	4000 (Solução Diluída 8x)	4000
32x	4000 (Solução Diluída 16x)	4000
64x	4000 (Solução Diluída 32x)	4000
128x	4000 (Solução Diluída 64x)	4000
256x	4000 (Solução Diluída 128x)	4000

3.5. Ensaio de citotoxicidade (MTT)

A citotoxicidade é descrita como o impacto de um composto químico (uma molécula), fenómeno físico (variação de temperatura, radiação ou ondas eletromagnéticas) ou agente biológico (bactéria) capaz de provocar danos numa célula. O composto que provoca danos na célula é, tipicamente, referido como substância citotóxica (Pithon et al., 2017).

O MTT (brometo 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il] -2,5- difeniltetrazólio), é um método colorimétrico, que permite avaliar a viabilidade celular, através da função da mitocôndria. O MTT, que inicialmente apresenta cor amarela, é reduzido pela enzima succinato desidrogenase presente na mitocôndria de células viáveis, originando formazano, um composto violeta e insolúvel em água. O dimetilsulfóxido (DMSO), solvente orgânico, dissolve o formazano, ficando violeta. A intensidade da coloração, vai ser proporcional à quantidade de formazano, que por sua vez reflete a quantidade de células viáveis (Mosmann, 1983).

Após 24 horas em contacto com os tratamentos, retirou-se o tratamento e adicionou-se 100 μL de solução MTT [3-(4,5-dimetiliazol-2-il) -2,5-brometo de difeniletetrazólio] a 0,5 mg/ml. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com uma incubação a 37°C e 5% CO₂, durante 2 horas. Após 2 horas, o reagente MTT foi recolhido e adicionado 100 μL de DMSO (dimetilsulfóxido). A absorbância foi lida num leitor de microplacas (Varioskan, Thermofisher) a 570nm. Os resultados foram realizados em triplicados e normalizados para o controlo (Meio DMEM sem FBS) considerando 100%.

3.6. Ensaio de migração celular

As células (Panc-1 e hTERT-HPNE), semeadas em placas de 6 poços à concentração de 5×10^5 células/ml, foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ em meio DMEM com 10% FBS, até atingirem a confluência de 80%. Após esse período de incubação, o meio foi removido, e foi realizada uma raspagem mecânica vertical. A área raspada foi, então, lavada com uma solução tampão PBS a 1%. Em seguida, foi adicionado 1 ml da saliva artificial a diferentes concentrações, como previamente descrito. Foram efetuadas 3 fotografias em cada poço no tempo 0 e após 24 horas da adição de cada tratamento para avaliar a área de migração. A taxa de migração foi calculada medindo a área do rasgo com recurso ao *software* Image J (Institutos Nacionais de Saúde dos EUA, Bethesda). Este é um teste que permite avaliar a capacidade de migração celular.

3.7. Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir de células semeadas em placas de 6 poços na concentração de 5×10^5 células/ml. O conteúdo celular foi homogeneizado com NZYOL (NZYtech) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi separado do conteúdo de DNA e proteína com clorofórmio e precipitado com isopropanol. O sedimento de RNA foi, então, lavado com etanol a 75% e eluído em água DEPC. A qualidade e a quantidade do RNA foram medidas em espectrofotômetro nanodrop (Varioskan, ThermoFisher). A relação abs 260/280 (>1,7 e <2,1) foi medida para verificar a pureza do RNA, ou seja, existência ou não de contaminação por proteínas ou DNA.

3.8. Síntese de cDNA

A conversão do RNA extraído em cDNA foi realizada com o qScript cDNA Synthesis KIT (QuantaBio, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Dos 20 µL de volume total, 15 µL correspondem à mistura de reação com a enzima transcriptase reversa (RT) e 5 µL ao RNA. A reação ocorreu no termociclador (BioRad) com as seguintes instruções: ativação da enzima a 22°C, 5 minutos; ação da enzima a 42°C, 30 min e, inativação da enzima, 85°C, 5 min. A qualidade e a quantidade do cDNA foram medidas em espectrofotômetro nanodrop (Varioskan, ThermoFisher). A concentração de cDNA foi normalizada, em todas as amostras, a 100 ng/µL.

3.9. PCR em tempo-real quantitativo (QPCR)

A expressão génica foi avaliada por PCR em Tempo Real quantitativo (qPCR), a partir de cDNA, utilizando o NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x) (NZYtech, Lisboa). A sequência dos *primers* utilizados encontram-se sumarizados na Tabela 2. A reação de PCR ocorreu de acordo com as especificações do fabricante, tendo sido adicionados 10 µL de NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x), 0,8µL de *primer Forward* (400 nM), 0,8µL de *primer reverse* (400 nM), 4 µL de cDNA (100ng/ µL), perfazendo o volume de 20 µL com água DEPC. As condições de PCR utilizadas foram: desnaturação a 95 °C durante 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 5 seg, annealing e extensão a 60°C durante 20 seg. A quantificação da expressão de mRNA foi calculada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Ct é *Cycling Threshold*), com o gene 18S como gene de referência.

Tabela 2

Lista de primers.

Gene		Sequência (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)
EGFR	Fw	GTGGTGACAGATCACGGCT	97
	Rw	GCCCTTCGCACTTCTTACAC	
PI3K	Fw	TGC ATT GTT TTG CAC CCC AAA	86
	Rw	TAG TGC CTG AGC CTC ATC TA	
mTOR	Fw	TTG GCT GTG CCA GGA ACA TA	95
	Rw	GGC CTC TGC TTG GAT GTG AT	
KRAS	Fw	TCG ACA CAG CAG GTC AAG AG	73
	Rw	CAA AGA AAG CCC TCC CCA GT	
PTEN	Fw	TCC ATC CTG CAG AAG AAG CC	88
	Rw	CTG TCA TGT CTG GGA GCC TG	
18S	Fw	ACC GCA GCT AGG AAT AAT GGA	63
	Rw	GCC TCA GTT CCG AAA ACC A	

3.10. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através da comparação dos resultados do grupo de controlo com os grupos de tratamento utilizando a análise de variância de um fator (ANOVA) com comparações múltiplas e o teste de Dunnet. Para isso, foi utilizado o *software* GraphPadPrism 8.0.1 (GraphPadSoftware, San Diego, EUA). Por fim, foi selecionado um intervalo de confiança de 95% (95% CI), e aplicou-se a todas as análises estatísticas um nível de significância de $p < 0,05$.

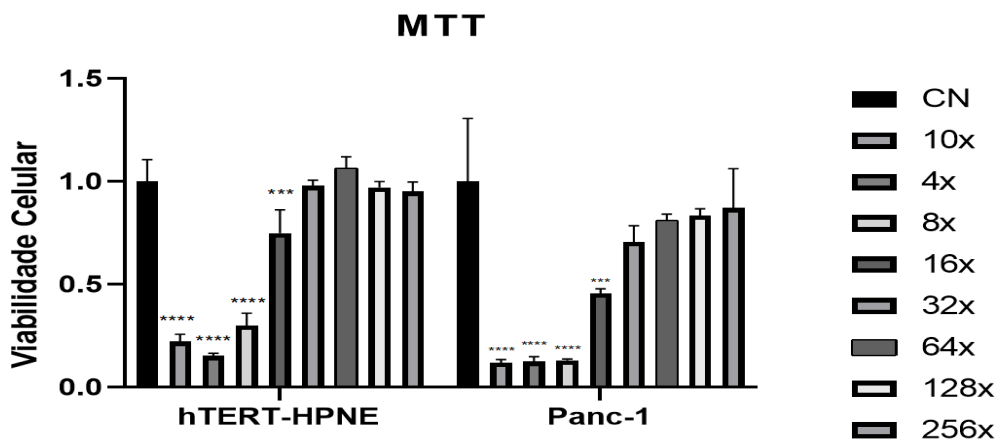
4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade da saliva artificial (MTT)

Na Figura 5 está representada a influencia na viabilidade celular das diferentes diluições da saliva artificial nas linhas celulares tumoral e não tumoral. Em ambas as linhas celulares, as diluições 4x, 8x e 10x mostraram uma redução na viabilidade celular significativa ($p < 0,0001$), assim como a diluição de 16x ($p < 0,001$), sugerindo elevada citotoxicidade da saliva artificial, nas linhas celulares em estudo. Por outro lado, as diluições 32x e superiores (64x, 128x, 256x) não mostraram uma alteração na viabilidade celular significativa. De uma forma geral, a linha celular tumoral (Panc-1) apresenta uma menor viabilidade celular em comparação à linha não tumoral (hTERT-HPNE) nas mesmas diluições, embora sem significância estatística.

Figura 5

*Viabilidade celular nas linhas celulares hTERT-HPNE e Panc-1, em contacto com diferentes diluições de saliva artificial. Ensaio realizado em triplicado, 24H após o tratamento. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$.*



4.2. Migração celular (*injury*)

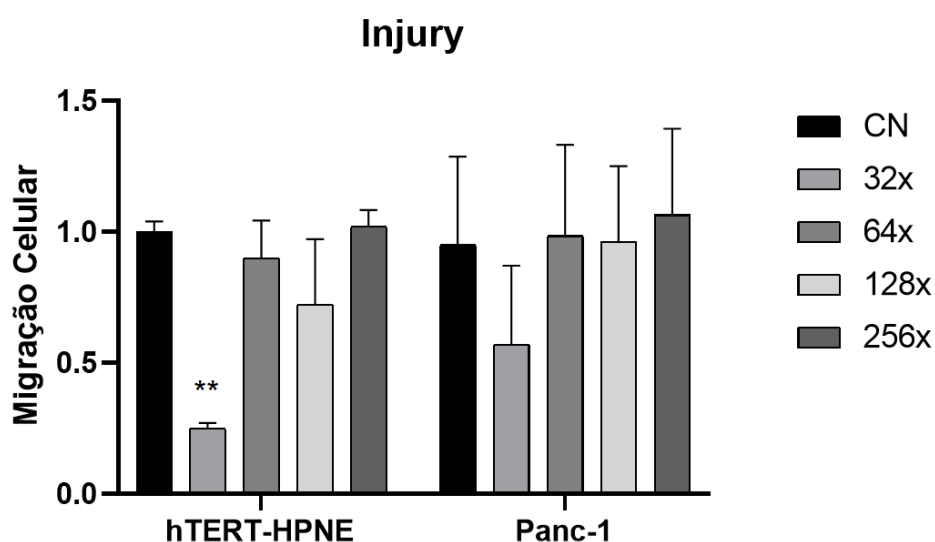
As diluições de saliva artificial que não demonstraram citotoxicidade nas linhas celulares em estudo prosseguiram para a avaliação do seu efeito na migração celular. Na Figura 6 está representada a influencia na migração celular das diferentes diluições da saliva artificial. Na linha celular hTERT-HPNE, a diluição 32x demonstrou uma diminuição

significativa na migração celular ($p < 0,001$), por outro lado, as restantes diluições em estudo não demonstram alteração significativa na capacidade de migração celular.

Na linha celular Panc-1, nenhuma das diluições testadas demonstrou alterar significativamente a capacidade de migração celular, embora a diluição 32x, à semelhança da linha não tumoral, mostre uma tendência para diminuir a migração celular.

Figura 6

*Migração celular nas linhas celulares hTERT-HPNE e Panc-1, em contacto com diferentes diluições de saliva artificial. Ensaio realizado em triplicado, 24H após o tratamento. ** $p < 0,01$.*



4.3. Níveis de expressão génica

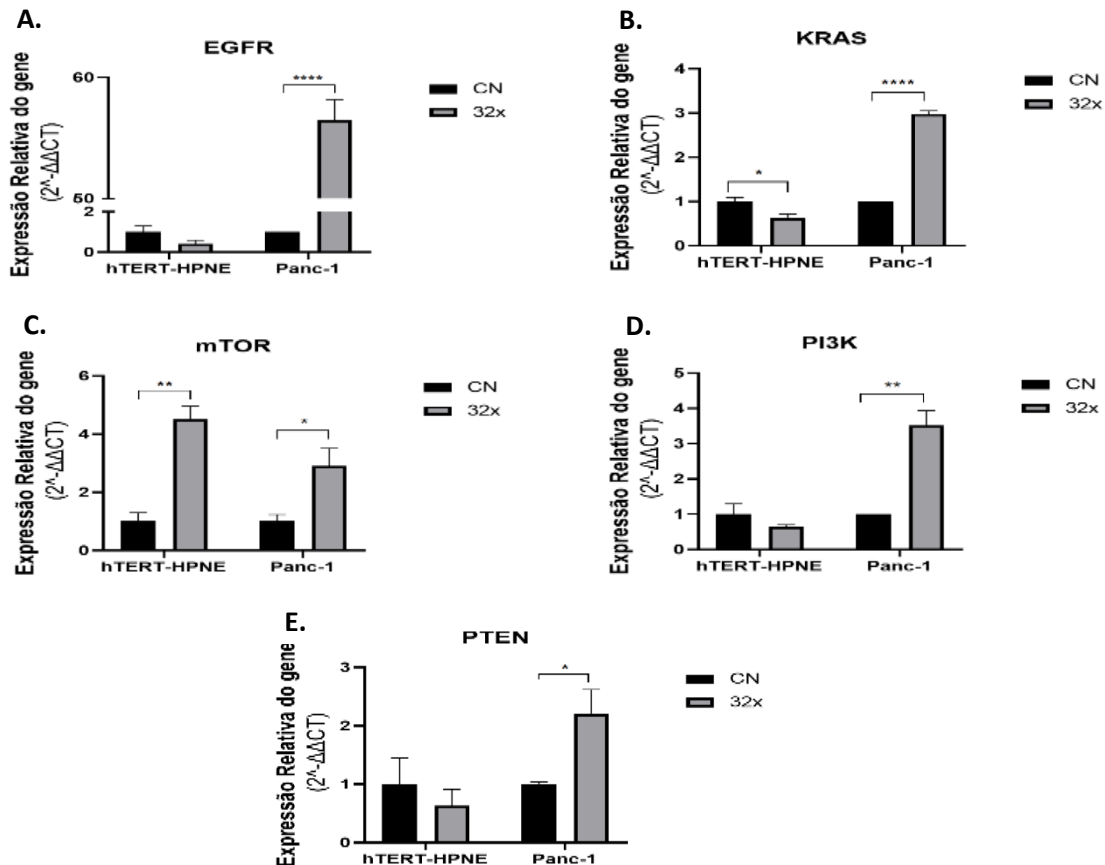
Foi avaliado o nível de expressão génica dos genes EGFR (Recetor do fator de crescimento epidérmico), KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) e PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), tendo sido utilizado o gene constitutivo 18S como gene de referência, na diluição de 32x da saliva artificial, uma vez que foi a concentração que demonstrou menor citotoxicidade nas células não tumorais e, simultaneamente, diminui a capacidade de migração em ambas as linhas celulares.

Na linha celular não tumoral hTERT-HPNE, não se observaram alterações significativas na expressão do gene EGFR entre o controlo negativo (CN) e a condição tratada com saliva artificial diluída 32x. Em contraste, na linha celular tumoral Panc-1, a expressão

deste gene aumentou significativamente na presença de saliva artificial diluída 32x, indicando uma elevada expressão do recetor promovida pela saliva nas células tumorais (Figura 7 - A). Quanto ao gene KRAS, na linha celular não tumoral observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da sua expressão na presença de saliva em comparação com o CN. Pelo contrário, na linha celular tumoral, a expressão do gene KRAS foi significativamente maior na presença de saliva, sugerindo que a saliva artificial pode promover a ativação da expressão deste gene nas células tumorais (Figura 7 – B).

Figura 7

*Expressão relativa dos genes EGFR (A), KRAS (B), mTOR (C), PIK (D) e PTEN (E), nas linhas celular não tumoral (hTERT-HPNE) e tumoral (Panc-1), após exposição a saliva artificial diluída 32x, em comparação com o controlo negativo (CN). $p < 0,05$; $**p < 0,01$; $*p < 0,001$; $***p < 0,0001$*



Na presença de saliva artificial diluída 32x observou-se um aumento estatisticamente significativo na expressão do gene mTOR em ambas as linhas tumorais. Por outro lado, a expressão do gene PI3K não sofreu alterações significativas na linha não tumoral na

presença de saliva em comparação com o CN, enquanto demonstrou um aumento significativo na linha tumoral, demonstrando uma ativação da via PI3K-AKT no tumor, em resposta à saliva artificial.

Por fim, a saliva artificial diluída 32x não influenciou significativamente a expressão do gene supressor tumoral PTEN na linha hTERT-HPNE, tendo aumentado significativamente a sua expressão na linha celular tumoral, o que pode indicar uma resposta compensatória para regular a sinalização celular.

Assim, estes resultados demonstram que a saliva artificial tem um impacto significativo na expressão de genes associados à proliferação e sobrevivência celular, especialmente na linha celular tumoral em estudo. Em contraste, a linha celular não tumoral foi menos influenciada pela presença de saliva, indicando uma resposta diferencial à saliva artificial entre as células tumorais e não tumorais.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, as funções fisiológicas da saliva e as opções terapêuticas para lidar com alterações na sua produção continuam a ser temas relevantes de discussão na comunidade científica. Muitos médicos dentistas mostram-se céticos quanto ao uso de medicamentos semelhantes à saliva, subestimando a sua importância. No entanto, a evidência científica baseada em revisões de literatura sugere que os substitutos de saliva podem trazer benefícios significativos para a saúde oral (Diaz-Arnold & Marek, 2002).

De acordo com Andrea (2022), a saliva desempenha um papel crucial no processamento dos alimentos que ingerimos. Além disso, o aparelho digestivo realiza múltiplas funções, incluindo atividade imunológica e proteção contra agentes patogênicos (bactérias e outros microrganismos nocivos). A saliva contém proteínas com funções específicas, como mucinas, imunoglobulinas, enzimas e produtos nitrogenados, cuja ausência pode levar a patologias e complicações graves ao longo do sistema digestivo, desde a cavidade oral até ao trato gastrointestinal (Andrea, 2022).

Diaz Arnold & Marek (2002) concluíram que a diminuição qualitativa e quantitativa da saliva aumenta a incidência de patologias orais, como cáries, candidíase oral, glossodinia, disartria e dismasesia. A xerostomia é a principal causa da boca seca, sendo uma condição frequente e subestimada. Segundo o Prof. Sílvio Abati, embora ainda não exista um tratamento eficaz para a xerostomia, o objetivo principal é melhorar os aspetos funcionais, como o conforto e as funções orais do paciente. Diversos tratamentos, incluindo géis e líquidos viscosos, estão disponíveis no mercado para aliviar rapidamente a sensação de boca seca (Diaz-Arnold & Marek, 2002). Cada paciente deve usar um tipo de saliva artificial específico, com base na sua condição clínica e nas suas necessidades, conforme afirma o Prof. Sílvio Abati. No entanto, ainda é necessária mais investigação para desenvolver saliva artificial que seja mais universal e semelhante à natural, considerando os possíveis efeitos iatrogênicos (Abati et al., 2011).

A radioterapia é uma das principais causas de xerostomia sendo, por isso, importante entender de que forma a saliva artificial pode afetar os tecidos, especialmente os submetidos a potenciais danos causados pela radioterapia. A radioterapia convencional pode causar hipossalivação, um efeito secundário comum, em comparação com a radioterapia modulada de intensidade reduzida (Figini, 2017). Uma alternativa emergente

para aumentar a atividade das glândulas salivares é a fotobiomodulação, conforme um estudo recente de Pulicari et al. (2024). Torna-se, então, importante considerar alguns medicamentos naturais que podem ser utilizados para combater a xerostomia. As ervas medicinais são ricas em agentes nutracêuticos e farmacêuticos, os quais são fonte de grande interesse para a comunidade científica (Pulicari et al., 2024).

De forma a avaliar a influência da saliva nas vias de inflamação celular, o estudo de Cvikl et al. (2015) investigou a capacidade da saliva em modular respostas inflamatórias em fibroblastos e células epiteliais. Os autores demonstraram que a saliva induzia fortemente a produção de IL-6 e IL-8 em fibroblastos de gengiva, palato e ligamento periodontal, embora o mesmo não tenha sido demonstrado em células epiteliais. Esta forte resposta inflamatória é dependente do fator nuclear Kappa B e da proteína-cinase ERK (Cvikl et al., 2015).

Adicionalmente, Müller et al. (2016) explorou se diferentes formulações de saliva artificial poderiam promover a síntese de quimiocinas. Utilizando a saliva Orthana, observou-se que as mucinas na saliva artificial induziam expressão significativa de IL-8 e potencialmente aumentavam a expressão de quimiocinas em fibroblastos gengivais. Os resultados sugerem que a saliva artificial pode induzir respostas celulares, mas a relevância clínica dessa indução permanece incerta (Müller et al., 2016). Finalmente, um estudo de Malpass et al. (2013) revelou que a amilase na saliva artificial poderia estimular a produção de IL-8 e IL-6, embora o mecanismo subjacente exato ainda seja desconhecido (Malpass et al., 2013).

Estes estudos destacam a importância da saliva e seus componentes em processos inflamatórios e a necessidade de monitorizar continuamente os dispositivos médicos no mercado, conforme estipulado pelo Regulamento Europeu MDR 2017/745, para garantir a segurança e eficácia do tratamento oferecido aos pacientes. A participação ativa dos clínicos na avaliação e monitorização de tratamentos, como o uso de saliva artificial, é crucial para a melhoria contínua dos cuidados de saúde.

No nosso trabalho experimental, avaliamos o efeito *in vitro* de uma marca de saliva artificial em linhas celulares de pâncreas, de forma a avaliar o seu efeito em linhas celulares tumorais, em comparação com linhas não tumorais. Os resultados demonstram que a saliva artificial possui um efeito citotóxico significativo nas linhas celulares de pâncreas (Panc-1 e hTERT-HPNE), em comparação com fibroblastos da gengiva (Müller et al. 2016), evidenciado pela redução da viabilidade celular nas diluições inferiores a 10x

($p < 0,0001$) até 16x ($p < 0,001$), apenas não tendo sido observadas alterações significativas na viabilidade a partir da diluição de 32x.

No ambiente oral, o pH pode variar devido à fermentação de açúcares pelas bactérias da placa e ao consumo de alimentos ácidos. Akay et al. (2017) estudou o efeito citotóxico (através de MTT) de diferentes biomateriais para dentaduras, na viabilidade de células de fibroblastos, após armazenamento em saliva artificial com diferentes pHs. Segundo os autores, a escolha de biomateriais orais deve considerar a influência do pH da saliva na sua citotoxicidade, assim como o pH da saliva pode influenciar a viabilidade das células (Akay et al., 2017).

Similarmente, Fabricky et al. (2022) avaliou dois tipos de cerâmicas, imersas em saliva artificial com diferentes pHs, analisando os seus efeitos em células de carcinoma faríngeo. Os resultados mostraram que as cerâmicas não apresentaram citotoxicidade significativa nem alterações na migração celular, descreditando uma interação desfavorável com as células tumorais em saliva artificial com diferentes pHs (Fabricky et al., 2022). Interessantemente, no nosso estudo, a linha celular tumoral (Panc-1) apresenta uma viabilidade celular inferior em comparação com a linha celular não tumoral (hTERT-HPNE) nas mesmas diluições e, embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística estes resultados sugerem que as células tumorais podem ser mais sensíveis à saliva artificial.

Tonguc Altin et al., (2021) determinaram os efeitos antibacterianos de diferentes substitutos salivares contendo lisozima ou lactoferrina sobre *Streptococcus mutans* em comparação com a saliva humana. Foi realizado um ensaio de cicatrização de feridas (injury) *in vitro* usando uma linha celular de fibroblastos exposta a diferentes concentrações destas enzimas. Os resultados demonstraram que ambas as enzimas aumentavam significativamente a cicatrização de feridas. Assim, os substitutos salivares contendo lisozima ou lactoferrina melhoram a atividade antimicrobiana e a cicatrização de feridas (Tonguc Altin et al., 2021). No nosso estudo, a saliva artificial analisada diluída 32x, reduziu significativamente a migração celular ($p < 0,001$) na linha celular não tumoral (hTERT-HPNE), não mostrando efeito significativo na capacidade de migração nas células tumorais (Panc-1). Estes resultados indicam que a saliva artificial pode afetar a migração celular, essencial para a cicatrização e regeneração dos tecidos. A redução da migração na linha não tumoral sugere um possível efeito adverso na cicatrização de feridas, embora sem afetar diretamente a viabilidade celular. Por outro lado, as células

tumorais demonstraram menor variação, apresentando uma ligeira redução na viabilidade e na capacidade de migração.

O efeito da saliva artificial nas vias de proliferação e sobrevivência de linhas tumorais e não tumorais foi avaliado pela análise da expressão dos genes EGFR, KRAS, PTEN, mTOR e PI3K. Os resultados apresentados revelam um impacto significativo da saliva artificial na expressão dos principais genes envolvidos nas vias de sinalização de proliferação e sobrevivência celular, especialmente na linha celular tumoral. Observou-se um aumento significativo na expressão do gene EGFR na linha celular tumoral quando tratada com saliva artificial diluída 32x, enquanto não se verificaram alterações significativas na linha celular não tumoral. Este aumento na expressão do EGFR nas células tumorais sugere uma potencial ativação das vias de sinalização *downstream*, promovendo a proliferação e sobrevivência celular características do comportamento tumoral. De acordo com Grapa et al. (2019), a sobreexpressão do EGFR é comum no carcinoma do pâncreas, contribuindo para a progressão do tumor, embora a sua relação com as taxas de sobrevivência celular permaneça controversa (Grapa et al., 2019).

Relativamente à expressão do gene KRAS, observou-se um aumento significativo na sua expressão na linha celular tumoral na presença de saliva artificial, contrariamente ao que ocorre na linha celular não tumoral, onde se verificou uma diminuição estatisticamente significativa. Este resultado corrobora que a saliva artificial pode promover a ativação do KRAS nas células tumorais, através da ativação com *feedback* positivo do EGFR, favorecendo a progressão tumoral (Eser et al., 2014). É importante considerar que, a mutação KRAS é a principal mutação encontrada nos tumores pancreáticos, presente em 85% dos casos. O crescimento tumoral é fortemente influenciado pelas mutações no gene RAS e pelas várias vias de sinalização *downstream*, especialmente a via PI3K/AKT/mTOR. Esta via favorece a proliferação, o crescimento, a sobrevivência e o metabolismo celular. Além disso, a atividade contínua dessas vias facilita a metástase das células tumorais (Luo, 2021).

No carcinoma do pâncreas, a sinalização KRAS envolve diversas vias, principalmente a via PI3K/AKT/mTOR. O mTOR, é essencial para a síntese proteica e crescimento celular (Eser et al., 2014). A expressão deste gene encontrou-se significativamente aumentada em ambas as linhas celulares (tumoral e não tumoral), sugerindo, nas células não tumorais, que a ativação da expressão do mTOR pode ocorrer por uma via alternativa à via PI3K/AKT/mTOR (Leiphrakpam et al., 2024).

Por outro lado, o PTEN atua como um supressor tumoral que antagoniza a via PI3K/AKT, ajudando a regular a sinalização celular e a prevenir o crescimento descontrolado das células tumorais (Eser et al., 2014). Neste estudo, a saliva artificial diluída 32x em contacto com as células tumorais promove a expressão do gene PTEN, o que pode indicar uma resposta compensatória para regular a sinalização celular.

Avaliar o efeito da saliva artificial em linhas celulares tumorais e não tumorais

6. CONCLUSÕES

A saliva desempenha um papel crucial no organismo, possuindo várias funções mecânicas e de proteção. Por sua vez, a diminuição da produção de saliva, ou xerostomia, pode resultar em diferentes patologias orais, como cáries e candidíase. Os substitutos salivares têm sido estudados como uma potencial solução para aliviar os sintomas de boca seca e melhorar a saúde oral. No entanto, devido às suas características específicas e capacidades adaptativas imunomediadas, a replicação eficaz da saliva em laboratório, evitando danos iatrogênicos, continua a ser um desafio, apesar dos inúmeros estudos em curso.

A xerostomia é uma condição comum, especialmente em pacientes submetidos à radioterapia, que pode causar hipossalivação. A fotobiomodulação surge como uma alternativa promissora para aumentar a atividade das glândulas salivares. Além disso, a saliva artificial é importante no controle dos sintomas. A saliva, por sua vez, também influencia respostas inflamatórias, aumentando a produção de citocinas em fibroblastos.

Estudos demonstram que os substitutos salivares contendo lisozima ou lactoferrina podem melhorar a atividade antimicrobiana e a cicatrização de feridas. O pH da saliva artificial também pode influenciar a citotoxicidade de biomateriais dentários, sobretudo em células não tumorais.

Neste estudo demonstramos a influência da saliva artificial na expressão dos principais genes envolvidos nas vias de proliferação e sobrevivência celular, tendo sido observado um aumento significativo da expressão desses genes nas células tumorais em estudo. Estes resultados preliminares *in vitro* demonstram a necessidade de investigações futuras de modo a compreender os mecanismos subjacentes às alterações observadas.

Avaliar o efeito da saliva artificial em linhas celulares tumorais e não tumorais

7. BIBLIOGRAFIA

- Abati, S., Associato, P., Medicina, D., & Odontoiatria, C. (2011). La bocca asciutta : un disturbo frequente e sottovalutato. *Società Italiana Di Medicina Generale*, 3, 42–45.
- Akay, C., Tanış, M., & Sevim, H. (2017). Effect of artificial saliva with different ph levels on the cytotoxicity of soft denture lining materials. *International Journal of Artificial Organs*, 40(10), 581–588. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000614>
- Alpöz, E., Güneri, P., Önder, G., Çankaya, H., Kabasakal, Y., & Köse, T. (2008). The efficacy of Xialine® in patients with Sjögren’s syndrome: a single-blind, cross-over study. *Clinical Oral Investigations*, 12(2), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s00784-007-0159-3>
- Alves, M. B., Motta, A. C. F., Messina, W. C., & Migliari, D. A. (2004). Saliva substitute in xerostomic patients with primary Sjögren’s syndrome: a single-blind trial. *Quintessence International*, 35(5), 392–396. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15130080>
- Andrea, G. (2022). Funzioni della saliva e molecole correlate. Una revisione bibliografica. *Revista Italiana Igiene Dentale*, 2022. <https://doi.org/https://www.rivistaitalianaigienedentale.it/funzioni-della-saliva-e-molecole-correlate-una-revisione-bibliografica/>
- Ata, S. O., & Yavuzylmaz, H. (2009). In vitro comparison of the cytotoxicity of acetal resin, heat-polymerized resin, and auto-polymerized resin as denture base materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 91(2), 905–909. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31473>
- Brito-Zerón, P., Baldini, C., Bootsma, H., Bowman, S. J., Jonsson, R., Mariette, X., Sivils, K., Theander, E., Tzioufas, A., & Ramos-Casals, M. (2016). Sjögren syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 1–20.
- Buckley, L. F., Viscusi, M. M., Van Tassell, B. W., & Abbate, A. (2018). Interleukin-1 blockade for the treatment of pericarditis. *European Heart Journal - Cardiovascular Pharmacotherapy*, 4(1), 46–53. <https://doi.org/10.1093/ehjcvp/pvx018>
- Carda, C., Mosquera-Lloreda, N., Salom, L., Gomez De Ferraris, M. E., & Peydró, A. (2006). A structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 11(4), 209–214.
- Carreira, L., Castelo, P. M., Simões, C., Capela E Silva, F., Viegas, C., & Lamy, E. (2020). Changes in salivary proteome in response to bread odour. *Nutrients*, 12(4), 1002. <https://doi.org/10.3390/nu12041002>
- Crane, F. L. (2001). Biochemical Functions of Coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(6), 591–598. <https://doi.org/10.1080/07315724.2001.10719063>
- Cvikl, B., Lussi, A., Moritz, A., Sculean, A., & Gruber, R. (2015). Sterile-filtered saliva is a strong inducer of IL-6 and IL-8 in oral fibroblasts. *Clinical Oral Investigations*, 19(2), 385–399. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1232-3>
- Dawes, C. (2012). Salivary clearance and its effects on oral health. *Saliva and Oral Health*, 5, 71–85.

- Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, *60*(6), 863–874. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>
- De Almeida, P. D. V., Grégio, A. M. T., Machado, M. Â. N., De Lima, A. A. S., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, *9*(3), 072–080. <https://doi.org/10.5005/jcdp-9-3-72>
- De Simone, V., Franzè, E., Ronchetti, G., Colantoni, A., Fantini, M. C., Di Fusco, D., Sica, G. S., Sileri, P., Macdonald, T. T., Pallone, F., Monteleone, G., & Stolfi, C. (2015). Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, *34*(27), 3493–3503. <https://doi.org/10.1038/ONC.2014.286>
- Decani, S., Baruzzi, E., Marziali, I., & Tarozzi, M. (2012). Xerostomia: dall'eziologia al trattamento. *Dental Cadmos*, *80*(10), 568–594. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cadmos.2012.05.002>
- Diaz-Arnold, A. M., & Marek, C. A. (2002). The impact of saliva on patient care: A literature review. *Journal of Prosthetic Dentistry*, *88*(3), 337–343. <https://doi.org/10.1067/mpr.2002.128176>
- Dodds, M. W. J., Johnson, D. A., & Yeh, C. K. (2005). Health benefits of saliva: A review. *Journal of Dentistry*, *33*(3 SPEC. ISS.), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009>
- Dufour, J. F., Huber, O., Kozma, S. C., Lu, X., & Toftgård, R. (2007). Tumour suppressors in liver carcinogenesis. *Journal of Hepatology*, *47*(6), 860–867. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.09.003>
- Erbasan, F., Alikanoğlu, A. S., Yazısız, V., Karasu, U., Balkarlı, A., Sezer, C., & Terzioğlu, M. E. (2016). Leptin and leptin receptors in salivary glands of primary Sjögren's syndrome. *Pathology Research and Practice*, *212*(11), 1010–1014. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.08.009>
- Eser, S., Schnieke, A., Schneider, G., & Saur, D. (2014). Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *British Journal of Cancer*, *111*(5), 817–822. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.215>
- Fabricky, M. M. C., Racea, R. C., Macasoi, I., Pinzaru, I., Sinescu, C., Manea, H. C., Rusu, L. C., Stoian, D., Buzatu, R., & Dinu, S. (2022). The In Vitro Impact of Two Scaffold-Type Structure Dental Ceramics on the Viability, Morphology, and Cellular Migration of Pharyngeal Cancer Cells. *Coatings*, *12*(8), 1212. <https://doi.org/10.3390/coatings12081212>
- Figini, L. (2017). La radioterapia di testa e collo può influenzare le proprietà meccaniche e la durata dei nostri restauri dentali? *Odontoiatria* *33*. <https://doi.org/https://www.odontoiatria33.it/conservativa/15705/la-radioterapia-di-testa-e-collo-puo-influenzare-le-proprietà-meccaniche-e-la-durata-dei-nostri-restauri-dentali.html>

- Foglio-Bonda, A., Foglio-Bonda, P. L., Bottini, M., Pezzotti, F., & Migliario, M. (2022). Chemical-physical characteristics of artificial saliva substitutes: rheological evaluation. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 26(21), 7833–7839. https://doi.org/10.26355/eurrev_202211_30132
- Furness, J. B., Rivera, L. R., Cho, H. J., Bravo, D. M., & Callaghan, B. (2013). The gut as a sensory organ. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(12), 729–740. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.180>
- Gao, X., Jiang, S., Koh, D., & Hsu, C. Y. S. (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000*, 70(1), 128–141. <https://doi.org/10.1111/prd.12100>
- Grapa, C. M., Mocan, T., Gonciar, D., Zdrehus, C., Mosteanu, O., Pop, T., & Mocan, L. (2019). Epidermal growth factor receptor and its role in pancreatic cancer treatment mediated by nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 9693–9706. <https://doi.org/10.2147/IJN.S226628>
- Holmstrup, P., Plemons, J., & Meyle, J. (2018). Non-plaque-induced gingival diseases. *Journal of Periodontology*, 89, S28–S45. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0163>
- Houghton, J. W., Carpenter, G., Hans, J., Pesaro, M., Lynham, S., & Proctor, G. (2020). Agonists of Orally Expressed TRP Channels Stimulate Salivary Secretion and Modify the Salivary Proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 19(10), 1664–1676. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.002174>
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169.
- Hwang, S. H., Gonzalez-Suarez, A. M., Stybayeva, G., & Revzin, A. (2021). Prospects and opportunities for microsystems and microfluidic devices in the field of otorhinolaryngology. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 14(1), 29–42. <https://doi.org/10.21053/ceo.2020.00626>
- Iwaszko, M., Biały, S., & Bogunia-Kubik, K. (2021). Significance of interleukin (IL)-4 and IL-13 in inflammatory arthritis. *Cells*, 10(11), 3000. <https://doi.org/10.3390/cells10113000>
- Janus, M. M., Willems, H. M. E., & Krom, B. P. (2016). *Candida albicans* in multispecies oral communities; a keystone commensal? In C. Imbert (Ed.), *Fungal Biofilms and related infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 3* (pp. 13–20). Springer Cham.
- Jha, N., Harris, J., Seikaly, H., Jacobs, J. R., McEwan, A. J. B., Robbins, K. T., Grecula, J., Sharma, A. K., & Ang, K. K. (2012). A phase II study of submandibular gland transfer prior to radiation for prevention of radiation-induced xerostomia in head-and-neck cancer (RTOG 0244). *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 84(2), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.02.034>
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G., & Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–14.
- Lavoie, T. N., Lee, B. H., Nguyen, C. Q., Link, C., Lavoie, T. N., Lee, B. H., & Nguyen, C. Q. (2013). Current Concepts : Mouse Models of Sjögren’s Syndrome Accessed Current Concepts : Mouse Models of Sjogren’s Syndrome. *BioMed Research International*, 2011(1), 549107.

- Leiphrakpam (2024) P.D.; Are, C. PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 3178. <https://doi.org/10.3390/ijms25063178>
- Lin, C. S., Wu, C. Y., Wang, D. H., Lin, H. H., Lo, K. C., Lo, W. L., Liu, L. K., Fuh, J. L., & Hsu, M. L. (2019). Brain signatures associated with swallowing efficiency in older people. *Experimental Gerontology*, 115, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2018.11.007>
- Llena-Puy, C. (2006). The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 11(5), 449–455.
- Loo, J. A., Yan, W., Ramachandran, P., & Wong, D. T. (2010). Comparative human salivary and plasma proteomes. *Journal of Dental Research*, 89(10), 1016–1023. <https://doi.org/10.1177/0022034510380414>
- Luo, J. (2021). KRAS mutation in pancreatic cancer. *Seminars in Oncology*, 48(1), 10–18. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2021.02.003>
- Łysik, D., Niemirowicz-Laskowska, K., Bucki, R., Tokajuk, G., & Mystkowska, J. (2019). Artificial saliva: Challenges and future perspectives for the treatment of xerostomia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3199. <https://doi.org/10.3390/ijms20133199>
- Malamud, D., Abrams, W. R., Barber, C. A., Weissman, D., Rehtanz, M., & Golub, E. (2011). Antiviral activities in human saliva. *Advances in Dental Research*, 23(1), 34–37. <https://doi.org/10.1177/0022034511399282>
- Malpass, G. E., Arimilli, S., Prasad, G. L., & Howlett, A. C. (2013). Complete artificial saliva alters expression of proinflammatory cytokines in human dermal fibroblasts. *Toxicological Sciences*, 134(1), 18–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft103>
- Miles, T., Nauntofte, B., & Svensson, P. (2004). *Clinical Oral Physiology*. Quintessence Publishing Company.
- Miller, E. M. (2021). Predictors of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist in infant saliva. *American Journal of Human Biology*, 33(3), e23477. <https://doi.org/10.1002/ajhb.23477>
- Moore, P. A., Guggenheimer, J., Etzel, K. R., Weyant, R. J., & Orchard, T. (2001). Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 92(3), 281–291. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.117815>
- Morquecho-Campos, P., Bikker, F. J., Nazmi, K., de Graaf, K., Laine, M. L., & Boesveldt, S. (2019). Impact of food odors signaling specific taste qualities and macronutrient content on saliva secretion and composition. *Appetite*, 143, 104399. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.104399>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Motsuo, R. (2000). Role of saliva in the maintenance of taste sensitivity. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 11(2), 216–229. <https://doi.org/10.1177/10454411000110020501>

- Müller, H. D., Cvikl, B., Lussi, A., & Gruber, R. (2016). Chemokine expression of oral fibroblasts and epithelial cells in response to artificial saliva. *Clinical Oral Investigations*, 20(5), 1035–1042. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1582-5>
- Naghavi, N., Ghoddusi, J., Sadeghnia, H. R., Asadpour, E., & Asgary, S. (2014). Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dental Materials Journal*, 33(1), 64–69. <https://doi.org/10.4012/dmj.2013-123>
- Napeñas, J. J., Brennan, M. T., & Fox, P. C. (2009). Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology*, 97(2), 76–83. <https://doi.org/10.1007/s10266-008-0099-7>
- Nathan, C. A. O., Asarkar, A. A., Entezami, P., Corry, J., Strojan, P., Poorten, V. Vander, Makitie, A., Eisbruch, A., Robbins, K. T., Smee, R., St. John, M., Chiesa-Estomba, C., Winter, S. C., Beitler, J. J., & Ferlito, A. (2023). Current management of xerostomia in head and neck cancer patients. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 44(4), 103867. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2023.103867>
- Ogle, O. E. (2020). Salivary gland diseases. *Dental Clinics*, 64(1), 87–104.
- Orzechowska-Wylęgała, B., Wylęgała, A., Zalejska Fiolka, J., Czuba, Z., & Toborek, M. (2024). Saliva-Based Protein Analysis in Pediatric Dentofacial Inflammation. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics*, 15, 95–102. <https://doi.org/10.2147/phmt.s440223>
- Pithon, M. M., De Santana, D. A., Santos, R. L., De Souza, R. A., De Freitas, L. M. A., & Romanos, M. T. V. (2017). Avaliação in vitro da citotoxicidade de bráquetes ortodônticos cerâmicos com e sem canaleta metálica. *Revista de Odontologia Da Universidade Cidade de São Paulo*, 23(3), 223. https://doi.org/10.26843/ro_unicid.v23i3.381
- Preetha, A., & Banerjee, R. (2005). Comparison of artificial saliva substitutes. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18(2), 178–186.
- Pulicari, F., Porrini, M., Barenghi, L., Ghizzoni, M., Paolo Modugno, F., Bosotti, M., Pellegrini, M., & Spadari, F. (2024). Fotobiomodulazione e xerostomia. *Dental Cadmos*, 92(3), 264–266. <https://doi.org/10.19256/d.cadmos.03.2024.11>
- Riley, P., Glenney, A. M., Hua, F., & Worthington, H. V. (2017). Pharmacological interventions for preventing dry mouth and salivary gland dysfunction following radiotherapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(7). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012744>
- Sahu, U., Biswas, D., Prajapati, V. K., Singh, A. K., Samant, M., & Khare, P. (2021). Interleukin-17—A multifaceted cytokine in viral infections. *Journal of Cellular Physiology*, 236(12), 8000–8019. <https://doi.org/10.1002/jcp.30471>
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, 52(12), 1114–1135. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009>
- Silvestre, F. J., Minguez, M. P., & Suñe-Negre, J. M. (2009). Clinical evaluation of a new artificial saliva in spray form for patients with dry mouth. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 14(1), E8–E11.

- Skutnik-Radziszewska, A., Maciejczyk, M., Fejfer, K., Krahel, J., Flisiak, I., Kołodziej, U., & Zalewska, A. (2020). Salivary Antioxidants and Oxidative Stress in Psoriatic Patients: Can Salivary Total Oxidant Status and Oxidative Status Index Be a Plaque Psoriasis Biomarker? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020(1), 9086024. <https://doi.org/10.1155/2020/9086024>
- Skutnik-radziszewska, A., Maciejczyk, M., Flisiak, I., Krahel, J., Kołodziej, U., Kotowska-rodziewicz, A., Klimiuk, A., & Zalewska, A. (2020). Enhanced inflammation and nitrosative stress in the saliva and plasma of patients with plaque psoriasis. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 745. <https://doi.org/10.3390/jcm9030745>
- Smith, G., Smith, A. J., Shaw, L., & Shaw, M. J. (2001). Artificial saliva substitutes and mineral dissolution. *Journal of Oral Rehabilitation*, 28(8), 728–731. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2001.00803.x>
- Stefano, S. (2020). Tutte le infezioni del cavo orale. *Studio Dentistico Cozzolino*. <https://doi.org/https://www.studiodentisticocozzolino.it/tutte-le-infezioni-del-cavo-orale/>
- Tenovuo, J. (2002). Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: Efficacy and safety. *Oral Diseases*, 8(1), 23–29. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.1o781.x>
- Tonguc Altin, K., Topcuoglu, N., Duman, G., Unsal, M., Celik, A., Selvi Kuvvetli, S., Kasikci, E., Sahin, F., & Kulekci, G. (2021). Antibacterial effects of saliva substitutes containing lysozyme or lactoferrin against *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral Biology*, 129, 105183. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105183>
- Tschope, P., Wolf, O., Eichhorn, M., Martus, P., & Kielbassa, A. M. (2011). Design of a randomized controlled double-blind crossover clinical trial to assess the effects of saliva substitutes on bovine enamel and dentin in situ. *BMC Oral Health*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-11-13>
- Turunen, M., Olsson, J., & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1660(1–2), 171–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.012>
- Ushikoshi-Nakayama, R., Ryo, K., Yamazaki, T., Kaneko, M., Sugano, T., Ito, Y., Matsumoto, N., & Saito, I. (2019). Effect of gummy candy containing ubiquinol on secretion of saliva: A randomized, double-blind, placebo-controlled parallel-group comparative study and an in vitro study. *PLoS ONE*, 14(4), e0214495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214495>
- Uz, U., & Eskiizmir, G. (2021). Association between interleukin-6 and head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review. *Clinical and Experimental Otorhinolaryngology*, 14(1), 50–60. <https://doi.org/10.21053/ceo.2019.00906>
- Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38(3), 247–253. <https://doi.org/10.1159/000077762>
- Vincis, R., & Fontanini, A. (2019). Central taste anatomy and physiology. *Handbook of Clinical Neurology*, 164, 187–204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63855-7.00012-5>

- von Karstedt, S., Conti, A., Nobis, M., Montinaro, A., Hartwig, T., Lemke, J., Legler, K., Annewanter, F., Campbell, A. D., Taraborrelli, L., Grosse-Wilde, A., Coy, J. F., El-Bahrawy, M. A., Bergmann, F., Koschny, R., Werner, J., Ganten, T. M., Schweiger, T., Hoetzenecker, K., ... Walczak, H. (2015). Cancer cell-autonomous TRAIL-R signaling promotes KRAS-Driven cancer progression, invasion, and metastasis. *Cancer Cell*, 27(4), 561–573. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.02.014>
- Wee, P.; Wang, Z (2017) Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers* 9, 52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>
- Yuan, Y., Kolios, A. G. A., Liu, Y., Zhang, B., Li, H., Tsokos, G. C., & Zhang, X. (2022). Therapeutic potential of interleukin-2 in autoimmune diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 28(7), 596–612. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2022.04.010>
- Zhang, Y., Liu, J. L., & Wang, J. (2020). KRAS gene silencing inhibits the activation of PI3K-Akt-mTOR signaling pathway to regulate breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition, proliferation and apoptosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(6), 3085–3096. https://doi.org/10.26355/eurrev_202003_20673