



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# Estudo de alterações na função salivar de um modelo de ratos pré- diabéticos

**Raquel Mouta nº40111**

**Mestrado em Ciências Biomédicas**

**2011**





Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# Estudo de alterações na função salivar de um modelo de ratos pré- diabéticos

**Raquel Mouta**

**Mestrado em Ciências Biomédicas**

Dissertação orientada por:

Professora Dra. Elsa Lamy  
Professora Dra. Célia Antunes  
Professor Dr. José Belo

**2011**





## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero mostrar a minha gratidão especial às duas pessoas mais importantes na realização deste trabalho, à professora Dra. Elsa Lamy e ao professor Dr. Fernando Capela e Silva. Sem o seu apoio, dedicação, compreensão e incentivo, este trabalho teria sido impossível de concluir. Agradeço ainda pela disponibilidade que mostraram e a confiança que depositaram em mim para a realização deste trabalho. A ambos, um muito obrigada!

Quero agradecer ainda à professora Dra. Célia Antunes e à professora Dra. Ana Costa, pelo apoio, orientação e atenção que me deram no decorrer da realização da realização deste trabalho, permitindo ultrapassar todas as dificuldades.

Quero agradecer à Lénia, pela amizade e companheirismo, pela pessoa disponível e compreensiva que sempre foi, que tanto me ajudou no decorrer deste ano. Sem a sua ajuda e incentivo, a realização deste trabalho não teria sido possível.

Às técnicas dos laboratórios de Bioquímica Sra. Anabela e Sra. Jesuína pela paciência e ajuda diária que me prestaram ao longo deste ano.

À técnica do Laboratório de Anatomia Patológica, Eng<sup>a</sup>. Luísa Fialho, pelos conhecimentos transmitidos e a disponibilidade, que apesar do imenso trabalho que tinha a seu cargo, nunca se recusou ajudar-nos, mostrando-se sempre prestável e receptiva.

Ao professor Dr. José Belo, pelo acompanhamento durante o ano curricular deste mestrado e apoio e atenção que prestou na procura do projecto para esta dissertação.

Ao meu namorado, pelo amor, companheirismo, compreensão e pelo apoio prestado, a todos os níveis, que tornou possível a conclusão deste trabalho.

Por fim, à minha família, em especial à minha mãe, pelo apoio que me deram durante todo o percurso escolar e académico, sem a qual nenhuma das realizações que alcancei até hoje teriam sido possíveis.



# Índice

Agradecimentos	I
Índice de Abreviaturas	V
Índice de Tabelas	VII
Índice de Figuras	IX
Resumo	XI
Abstract	XIII
1. Introdução	
1.1 Diabetes	1
1.1.1 Epidemiologia e Patologia	1
1.1.2 Pré-diabetes ou intolerância à glicose	3
1.1.3 Modelos animais da Diabetes Mellitus	5
1.2 Saliva	5
1.3 Glândulas Salivares	7
1.4 Saliva e Diabetes	10
2. Métodos	13
2.1 Animais	13
2.2 Teste de tolerância à administração da glicose oral	13
2.3 Recolha de saliva	14
2.4 Determinação da concentração proteica das amostras de saliva	14
2.4.1 Método de Bradford	15
2.4.2 Método de Lowry	16
2.5 Separação das proteínas por electroforese SDS PAGE	16
2.6 Imunodeteção de proteínas – Western Blott	18
2.7 Análise histológica e morfométrica das glândulas salivares	19
2.8 Imuno-histoquímicas das glândulas salivares	20
2.9 Análise Estatística dos dados	21
3. Resultados	23
3.1 Intolerância à glicose	23
3.2 Concentração proteica	24
3.3 Western Blott	25
3.4 SDS PAGE	25
3.5 Análise histológica das glândulas salivares	26
3.6 Imuno-histoquímica das glândulas salivares	28
4. Discussão	33
5. Conclusão	38
6. Referências	41
ANEXOS	47



## Índice de abreviaturas

**ADA** – American Diabetes Association

**APS** – Ammonium Persulfate

**BB rat** – Biobreeding rat

**BSA** – Bovine Serum Albumin

**CBB** – Coomassie Brilliant Blue

**DAB** – Diaminobenzidine

**DM** – Diabetes Mellitus

**GIR** – Glucose Intolerant Rat

**GLM** – General Linear Model

**H&E** – Hematoxylin and Eosin

**HSA** – Human Serum Albumin

**IgA** – Imunoglobina A

**IgG** – Imunoglobina G

**MW** – Molecular Weight

**NOD mice** – Non Obese Diabetic mice

**PBS** – Phosphate buffered Saline

**PRP** – Proline-rich Protein

**PVDF** – Polyvinylidene fluoride

**SDS-PAGE** – Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**TBS-T** – tert-butyldimethylsilyl

**TEMED** – Tetramethylethylenediamine

**WHO** – World Health Organization



## Índice de tabelas

<b>Tabela I.</b> Níveis de glicose em três estados diferentes do indivíduo .....	4
<b>Tabela II.</b> Valores de glicemia .....	23
<b>Tabela III.</b> Histomorfometria dos ácinos das glândulas salivares.....	26
<b>Tabela IV.</b> Intensidade da marcação para a $\alpha$ -amilase nas diferentes estruturas das glândulas.....	30
<b>Tabela V.</b> Concentração proteica total média da saliva.....	Anexo I
<b>Tabela VI.</b> Concentrações proteicas totais dos animais dos grupos Controlo e GIR.....	Anexo I
<b>Tabela VII.</b> Comparação das percentagens de volume das bandas de $\alpha$ -amilase entre os grupos controlo e GIR, para os vários géis SDS PAGE analisados.....	Anexo II



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Células alvo da libertação de insulina e consequências da sua actuação.....	1
<b>Figura 2.</b> Factores que determinam a ocorrência de DM tipo II. A predisposição genética e o modo de vida do indivíduo levam a uma sequencia de alterações no organismo, que conduzem à DM tipo II.....	3
<b>Figura 3.</b> Constituição da saliva mista em humanos.....	7
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo da unidade básica da glândula salivar.....	9
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do modo de execução da <i>sandwich</i> na cassette .....	18
<b>Figura 6.</b> Curvas médias de intolerância à glicose dos grupos GIR e Controlo .....	24
<b>Figura 7.</b> Imagem da membrana revelada por Western Blot com marcação para a $\alpha$ -amilase.....	25
<b>Figura 8.</b> Imagem do gel SDS Page corado com CBB R-250 .....	26
<b>Figura 9.</b> Glândulas parótidas.....	27
<b>Figura 10.</b> Glândulas submandibulares.....	27
<b>Figura 11.</b> Glândulas sublinguais.....	28
<b>Figura 12.</b> Imunomarcção para a actina, evidenciada pela cor castanha, em secção de de glândula sublingual.....	29
<b>Figura 13.</b> Imunomarcção para a actina, evidenciada pela cor castanha, em secção de glândula sublingual, com marcada expressão no citoplasma das células dos ductos ....	29
<b>Figura14.</b> Imunomarcção para a $\alpha$ -amilase, evidenciada pela cor castanha, em secção de glândula parótida.....	31
<b>Figura15.</b> Imunomarcção para a $\alpha$ -amilase, evidenciada pela cor castanha, em secção de glândula submandibular.....	31
<b>Figura 16.</b> Imunomarcção para a $\alpha$ -amilase, evidenciada pela cor castanha, em secção de glândula sublingual.....	31
<b>Figura 17.</b> Análise estatística das concentrações proteicas totais a todas as amostras de saliva recolhidas aos grupos Controlo e GIR.....	Anexo I
<b>Figura 18.</b> Output da análise estatística referente ao perímetro e área da glândula parótida em Controlo e GIR.....	Anexo III

**Figura 19.** Output da análise estatística referente ao perímetro e área da glândula submandibular em Controlo e GIR.....Anexo III

**Figura 20.** Output da análise estatística referente ao perímetro e área da glândula sublingual em Controlo e GIR.....Anexo III

## Resumo

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica com uma distribuição mundial cada vez mais acentuada, acarretando consigo, elevada morbidade e mortalidade. Deste modo, é de suma importância a compreensão e estudo em fases precoces desta doença.

Nos últimos anos a saliva tem sido usada como fonte de biomarcadores para detecção e monitorização de doenças. Para além disso, há referências a alterações na secreção salivar e percepção dos alimentos em indivíduos diabéticos, tornando-se importante um maior conhecimento da função salivar associada a esta patologia.

O objectivo geral deste trabalho é estudar a função salivar num modelo de roedores intolerantes à glicose, avaliando-se a concentração proteica total da saliva, morfologia e morfometria das glândulas salivares maiores e expressão da amilase na saliva e glândulas salivares.

Não se observam diferenças entre os grupos, para a concentração em proteína total, nem para a expressão de  $\alpha$ -amilase, na saliva.

Na análise histológica das glândulas salivares maiores é possível observar dimensões significativamente maiores dos ácinos das glândulas analisadas (parótida, submandibular e sublingual), em relação aos animais normoglicémicos, sugerindo o que pode ser o início de uma patologia comum em diabéticos, a sialose (hipertrofia e hiperplasia das glândulas salivares).

Através de imunomarcção para a actina observa-se um aumento da expressão de células mioepiteliais na seguinte ordem: parótida, submandibular e sublingual. Não se observam diferenças entre os grupos.

A imunomarcção para a  $\alpha$ -amilase é mais intensa nos ácinos da parótida, nos ductos granulares da submandibular e nas meias luas serosas da sublingual, em ambos os grupos. Verifica-se uma sobre-expressão nos ductos intralobulares da parótida e nos

ductos granulares da submandibular, nos animais pré-diabéticos, sugerindo alguma endocitose da enzima por parte das células dos ductos.

Os resultados obtidos sugerem alterações na função salivar, numa fase prévia ao desenvolvimento da Diabetes Mellitus, as quais merecem ser exploradas.

Palavras-chave: *-amilase, electroforese, glândulas salivares, histologia, pré-diabetes, saliva.*

## Abstract

Diabetes Mellitus is a metabolic disease with a worldwide distribution greatly increasing, leading to high morbidity and mortality. Thus, it is very important to understand and study the early stages of this disease.

In recent years saliva has been gained attention as a source of biomarkers for detection and monitoring of diseases. In addition, there are also studies referring changes in salivary secretion and perception of food in diabetic individuals, making it important to have a better understanding of salivary function associated with this pathology.

The overall objective of this work is to study the salivary function in a glucose intolerant rodent model, namely through analysis of the total saliva protein concentration, morphology and morphometry of the salivary glands and expression of amylase in saliva and salivary glands.

There are no differences between groups for total protein concentration, neither for the expression of  $\alpha$ -amylase in saliva.

In the histological analysis of major salivary glands it is observed significantly greater dimensions of the lobes of the glands examined (parotid, submandibular and sublingual), compared to control animals, suggesting what could be the beginning of a condition common in diabetics, sialose (hypertrophy and hyperplasia of the salivary glands).

Using immunostaining for actin, it is observed an increased expression of myoepithelial cells in the following order: parotid, submandibular and sublingual. There are no differences between groups.

Immunostaining for  $\alpha$ -amylase is more intense in the parotid acini, submandibular granular ducts and sublingual serous demilunes, for both groups. There is an over-expression in the parotid intralobular ducts and the ducts of the granular

sumandibular in pre-diabetic animals, suggesting some endocytosis of the enzyme by ductal cells.

The results suggest changes in salivary function in a stage prior to development of Diabetes Mellitus, which are worth exploring.

Keywords: *-amilase, electrophoresis, histology, prediabetes, saliva, salivary glands.*

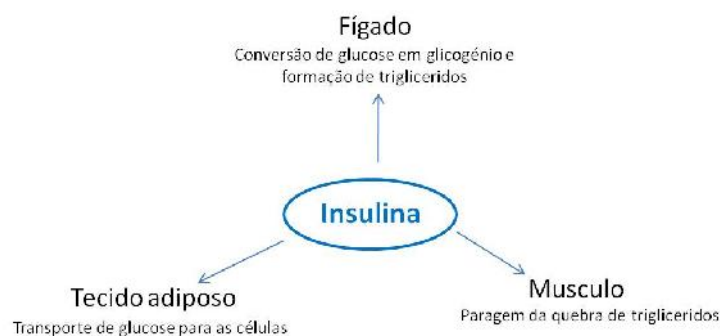
# 1. Introdução

## 1.1 Diabetes

### 1.1.1 Epidemiologia e Patologia

A Diabetes Mellitus (DM) afecta actualmente mais de 220 milhões de pessoas em todo o mundo e é responsável pela morte de, pelo menos, 1,1 milhões de pessoas por ano (WHO, 2011). O número de indivíduos com esta patologia tem vindo a aumentar, entre outros factores, com o crescimento populacional, o aumento da esperança média de vida e o aumento da taxa de obesidade associado à inactividade física (Schneider *et al.*, 2003). A nível mundial prevê-se que o número de indivíduos diabéticos seja da ordem dos 320 milhões no ano 2025, quase o dobro dos 180 milhões identificados em 2000 (Vernillo, 2001).

A DM é uma doença metabólica crónica, de etiologia genética e comportamental, resultante de uma produção insuficiente, ou inexistente, de insulina, por parte do pâncreas e/ou de uma incapacidade, por parte dos tecidos, de usar eficientemente a insulina endógena (Hamman, 1992). A insulina é uma hormona anabolizante que actua no armazenamento de substâncias energéticas e possui também um papel importante no metabolismo dos hidratos de carbono, proteínas e lípidos (Leite, 2006). Sendo a insulina a hormona responsável pela regulação do sistema de transporte da glicose celular (Fig.1), uma deficiência na sua produção, ou uma insensibilidade por parte dos receptores presentes nos órgãos alvo resultam num aumento crónico dos níveis de glicose no sangue (Tatón *et al.*, 2010). Adicionalmente, associada à DM, há uma neoglicogénese aumentada que também contribui para o estado de hiperglicemia observado nestes indivíduos (Alberti *et al.*, 2003).



**Figura 1** - Células alvo da libertação de insulina e consequências da sua actuação.

A mais antiga referência à diabetes que se conhece é possivelmente a que consta num papiro egípcio, datado de 1500 a.C., onde se pode ler “*um medicamento para afastar a passagem de muita urina*” (Tattersall, 2009). Quando os níveis de glicose aumentam demasiado, a sua reabsorção pelos rins é insuficiente, fazendo com que parte permaneça na urina (glicosúria). Assim, a pressão osmótica da urina aumenta e a reabsorção de água pelo rim é inibida, o que resulta num aumento da produção de urina (poliúria) e aumento de perda de fluidos. A perda de volume sanguíneo será então repostada osmoticamente pela água retida nas células corporais causando desidratação e, conseqüentemente, sede (polidipsia), um sintoma muito comum de indivíduos diabéticos.

A longo prazo, a hiperglicemia crónica causa complicações ao nível de diversos órgãos como retinopatia (olhos), insuficiência renal (rins), neuropatias (SNC), aterosclerose, ataques cardíacos, coma, podendo mesmo ser responsável pela morte dos indivíduos (ADA, 2004).

Existem dois tipos de DM: DM tipo I e DM tipo II. A DM tipo I caracteriza-se pela destruição das células beta pancreáticas, produtoras de insulina, levando a uma ausência de secreção desta hormona. A maioria dos casos de DM tipo I é de natureza imunitária, onde a perda de células beta é devida a um ataque autoimune por parte das células T. A DM tipo I corresponde a aproximadamente 10% dos casos de DM na Europa e América do Norte, apresentando uma incidência mais reduzida em regiões tropicais (Tisch e McDevitt, 1996).

A DM tipo II é causada pela resistência à acção de insulina, que pode ser combinada com alguma redução na secreção desta hormona. Este é o tipo de DM mais comum, cujo número de casos se encontra em ascensão em todo o mundo, representando 90% do total de casos de diabetes (WHO, 2011). Este tipo de diabetes resulta de uma interacção entre uma predisposição genética e factores de risco ambientais e comportamentais, como o sedentarismo e a obesidade (Jaakko *et al.*, 2001) (Fig. 2).



**Figura 2** - Factores que determinam a ocorrência de DM tipo II. A predisposição genética e o modo de vida do indivíduo levam a uma sequência de alterações no organismo, que conduzem à DM tipo II.

Para além dos dois tipos de DM referidos, existe ainda a diabetes gestacional. Este tipo de diabetes assemelha-se à DM tipo II em diversos aspectos, incluindo a combinação de uma secreção inadequada de insulina e uma baixa resposta dos tecidos a esta. Ocorre entre 2-5% das gestantes, e pode desenvolver-se ou desaparecer após o parto. Este tipo de diabetes pode causar danos tanto na mãe como no feto (WHO, 2011).

### 1.1.2 Pré-diabetes ou Intolerância à Glicose

Para um indivíduo ser considerado diabético tem que apresentar três condições principais: glicose plasmática em jejum superior a 126mg/dL, glicose plasmática ocasional superior a 200mg/dL e glicémia superior a 200mg/dL 2h após prova de tolerância à glicose oral (Paiva, 2001).

No entanto, actualmente é já considerada uma outra situação que se caracteriza pela existência de níveis de glicose sanguínea acima do normal ( 100mg/dL e <126mg/dL), embora não suficientemente elevados, de acordo com os critérios, para se considerar DM tipo II. Para além disso, estes indivíduos apresentam também glicemias pós prandial mais elevadas que o normal, e cujos valores demoram mais tempo a retornar aos valores de jejum (ADA, 2004). Esta situação é considerada como pré-diabetes ou intolerância à glicose (Tabela I).

**Tabela I** – Níveis de glicose em três estados diferentes do indivíduo<sup>1</sup>

	<b>Normal</b>	<b>Intolerância à glicose</b>	<b>Diabetes</b>
Glicose em jejum	<100 mg/dl <6.1 mmol/l	100-125 mg/dl 6.1-6.9 mmol/l	126 mg/dl 7.0 mmol/l
2 h após teste oral de tolerância à glicose	<140 mg/dl <7.8 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l	200 mg/dl 11.1 mmol/l

<sup>1</sup>Adaptada de [www.scienceinschool.org](http://www.scienceinschool.org)

Segundo um estudo realizado em 2003 (Weiss *et al.*, 2003), crianças com intolerância à glicose apresentam já uma profunda resistência periférica à insulina e defeitos na via metabólica não oxidativa da glicose, sem aumentos compensatórios na secreção de insulina. Conseqüentemente, estes indivíduos têm um risco aumentado de vir a contrair DM tipo II, constituindo assim um grupo importante a ser alvo de intervenções que visem prevenir a doença.

Estudos indicam que a evolução para DM tipo II pode ser prevenida com a alteração do estilo de vida, nomeadamente através de uma alimentação saudável e exercício físico regular (Jakkoo *et al.*, 2001; ADA, 2004). Este tipo de intervenção aplicada a pacientes de risco elevado torna-se importante uma vez que, quando diagnosticada, o grau de desenvolvimento da diabetes pode já acarretar outras complicações associadas, mesmo assintomáticas, como complicações cardiovasculares, hipertensão, entre outras. Assim, a alteração do estilo de vida de pacientes intolerantes à glicose, não só diminui esta intolerância como reduz a magnitude de diversos factores de risco cardiovasculares (ADA, 2004).

Sendo uma patologia sistémica, a diabetes provoca alterações em diversos tecidos e órgãos do paciente, incluindo a nível oral. Alguns dos efeitos podem ser xerostomia, perda de dentes, gengivite, periodontite, abscessos odontogénicos e lesões nos tecidos moles da língua e mucosa oral (Lopez e Colloca, 2003; Mealey e Ocampo, 2007). Pensa-se que estas complicações possam ser consequência de alterações quantitativas e/ou qualitativas da saliva, o que torna útil o estudo deste fluido em pacientes diabéticos (Moore *et al.*, 2001). Mais à frente debruçar-nos-emos sobre este assunto.

### **1.1.3 Modelos animais na Diabetes Mellitus**

Nos diversos estudos já realizados sobre a diabetes, têm sido utilizados diferentes modelos animais, consoante o tipo de diabetes e o objecto de estudo. Inicialmente, era usado aloxano como agente diabetogénico em ratos, uma toxina selectiva das células pancreáticas que causa inibição da glucocinase (Marles e Farnsworth, 1995). No entanto, devido ao efeito tóxico no fígado e rins dos animais tratados com este fármaco, o mesmo foi sendo substituído pela estreptozotocina (Malaisse, 1982; Rakeiten *et al.*, 1993). A estreptozotocina estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disjunção das células dos ilhéus de Langerhans do pâncreas (Marles e Farnsworth, 1995). Ambos os agentes permitem manter os animais num estado diabético estável indefinidamente. Dada a inexistência de produção de insulina por parte destes animais, estes modelos reflectem mais adequadamente uma situação de DM tipo I. Outros modelos animais com DM tipo I foram criados pelos laboratórios Wistar, desenvolvendo sintomas que mimetizam bem a gravidade e a progressão da doença em humanos, os BioBreeding Rats (BB rat), modificados geneticamente (Tannenbaum *et al.*, 1981). Existem outros modelos geneticamente modificados, como os ratos db/db e NOD (*Non-Obese-Diabetic*) usados para o estudo da DM tipo II (Stearns e Benzo, 1983).

O modelo usado neste estudo foi um modelo de intolerância à glicose desenvolvido no biotério de Farmacologia da Universidade de Évora, através do cruzamento consanguíneo de ratos Wistar intolerantes à glicose, em gerações sucessivas. Ao longo deste trabalho este modelo será designado de GIR (*Glucose Intolerant Rat*). Sendo a intolerância à glicose considerada uma predisposição para o desenvolvimento da diabetes tipo II, o estudo deste modelo animal revela grande interesse no que respeita à descoberta de biomarcadores que permitam diagnosticar a DM numa fase mais precoce.

## **1.2 Saliva**

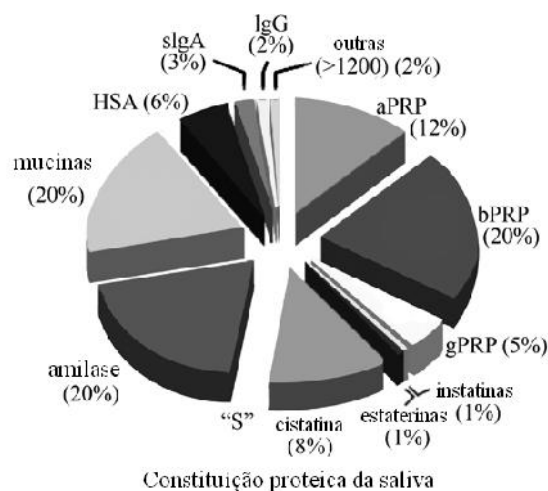
Nos últimos tempos, com desenvolvimentos na área da proteómica, o estudo da saliva sofreu um forte incremento, tornando-se útil como fonte de biomarcadores de

diversas doenças sistémicas, tirando partido do acesso simples a este fluido, através de métodos indolores e não invasivos (Scarano, 2010).

O fluido oral é constituído maioritariamente por água, e por substâncias orgânicas e inorgânicas, de entre os quais electrólitos, glicoproteínas, enzimas antimicrobianas, imunoglobulinas e numerosos outros constituintes importantes como a glicose e a amilase, que desempenham papéis preponderantes no funcionamento da cavidade oral (Arati *et al.*, 2010; Scarano, 2010). Os electrólitos podem estar envolvidos na formação de cálculos e na protecção contra as cáries, como o cálcio e o fosfato, e conferir um efeito tampão, como é o caso do bicarbonato, permitindo a manutenção do pH com valores entre 6 e 7 (Humphrey e Williamson, 2001). Estão presentes ainda outros electrólitos como o sódio e o potássio. No que diz respeito às substâncias orgânicas, estas compreendem uma vasta gama de proteínas (Fig. 3), na sua maioria multifuncionais, sendo as mais preponderantes as mucinas e a amilase salivar (Edgar e O'Mullane, 1996). Outras proteínas como imunoglobulinas, factores anti-bacterianos e anti-fúngicos, histatinas, cistatinas e estaterinas desempenham outras funções importantes na saliva (Eckert *et al.*, 1988). Existem ainda produtos azotados, como ureia e amónia, que também auxiliam na manutenção do pH e na capacidade tampão da saliva (Humphrey e Williamson, 2001). As mucinas salivares são mucopolissacarídeos cuja principal função é lubrificar e proteger os tecidos da cavidade oral. Estas proteínas conferem viscosidade à saliva, tendo a capacidade de aglutinar partículas alimentares e microrganismos e também ajudam na manutenção dos valores de pH da cavidade oral, dado o seu elevado poder tampão (Eckert *et al.*, 1988).

A grande maioria das proteínas salivares é produzida pelas glândulas salivares maiores e uma pequena parte pelas menores, no entanto existem também na saliva proteínas provenientes do sangue, de tecidos da cavidade oral e microrganismos. A composição proteica da saliva depende ainda de numerosos factores, designadamente, sexo, idade, dieta, ritmo circadiano, entre outros (Caseiro, 2007).

Assim, a principal função da saliva é proteger a membrana mucosa do ducto alimentar e os dentes, desempenhando os papéis de lubrificação (principalmente através das suas propriedades de visco-elasticidade) tamponamento, mineralização, limpeza e actividade anti-microbiana. No entanto, para além da função de protecção, a saliva participa ainda na percepção do paladar e nas primeiras fases da digestão (Edgar, 1992; Scarano, 2010).



**Figura 3** - Constituição da saliva mista em humanos (Scarano, 2010)

A amilase salivar (ou ptialina), enzima que hidrolisa o amido em maltose, é responsável pelo início da digestão dos polissacarídeos, da boca até ao estômago, onde é desactivada pelo ácido gástrico (Eckert *et al.*, 1988; Moriel *et al.*, 2010). Esta é a enzima mais abundante na saliva e é segregada principalmente pelas glândulas parótidas (cerca de 80%) (Nater, 2009). Além da função digestiva, a amilase possui afinidade para a hidroxiapatite, participando na formação da película de esmalte e na colonização bacteriana (Vacca e Bowen, 2000). Esta enzima é ainda indicadora da actividade do sistema nervoso simpático, uma vez que a sua secreção é regulada por este sistema. Deste modo, a amilase constitui um excelente marcador de alterações corporais relacionadas com o *stress*, estando a sua secreção aumentada nestas situações (Nater, 2009).

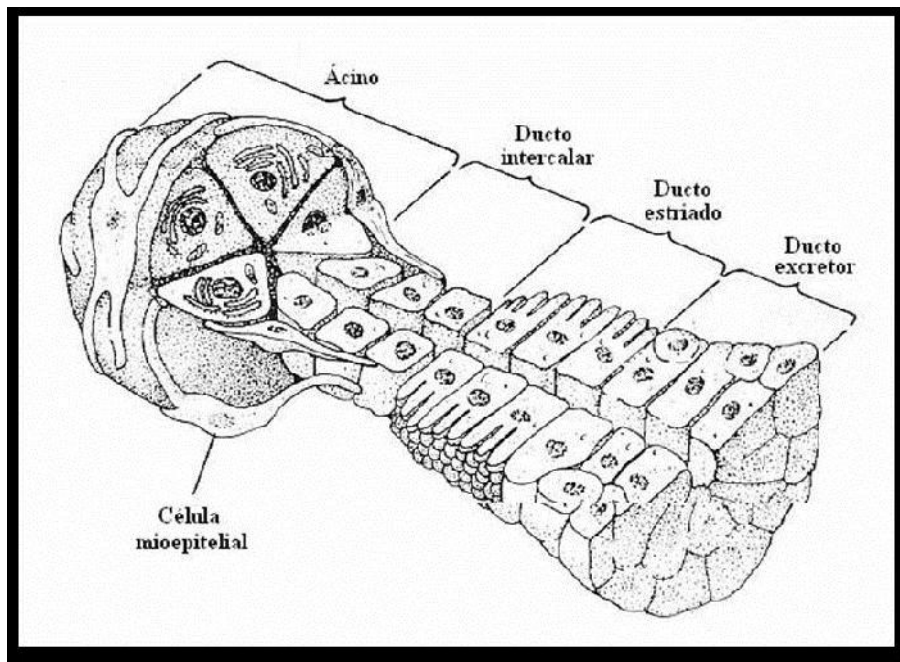
### 1.3 Glândulas salivares

A saliva é produzida pelas glândulas salivares, num volume de, aproximadamente 750mL por dia (Chicharro, 1998). É após a secreção do fluido glandular para a cavidade oral que este se mistura com bactérias, células de revestimento, secreções nasais e dos brônquios e recebe o nome de saliva. As glândulas salivares são glândulas exócrinas classificadas em dois grupos, de acordo com o seu tamanho e volume de fluido secretado: glândulas salivares menores e glândulas salivares maiores (Gonçalves e Bairos, 2007).

As glândulas salivares menores estão distribuídas pela língua, palato, mucosa bucal e mucosa labial (Ellis *et al.*, 1991).

As glândulas salivares maiores compreendem as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais e são responsáveis pela produção de 90% da saliva total (Perdersen *et al.*, 2002). Estas glândulas segregam saliva como resposta a estímulos nervosos desencadeados, nomeadamente, pela percepção dos alimentos através dos sentidos. Estes estímulos são provenientes no sistema nervoso autónomo simpático e parassimpático. Ambos os ramos estimulam a secreção, ainda que a acção parassimpática esteja principalmente associada a um aumento quantitativo da produção do fluido salivar sendo o ramo simpático o principal responsável pela síntese e secreção de proteínas (Emmelin, 1987). No entanto, esta divisão entre produção de fluido ou de proteína não é estanque, havendo uma acção sinérgica entre os dois ramos do sistema nervoso autónomo. Para além disso, a estimulação por parte do sistema nervoso simpático parece induzir mais a libertação de proteínas através do ácinos das glândulas parótida e submandibular, enquanto a estimulação parassimpática provoca a libertação de proteínas da glândula sublingual e em menor quantidade da parótida (Quissell e Tabak, 1989; Spearman e Butcher, 1989).

O parênquima glandular é constituído por unidades secretoras terminais, os ácinos e um sistema de ductos, responsáveis pelo transporte das secreções. O ducto secretor principal da glândula divide-se em ductos estriados, progressivamente mais pequenos, que por sua vez se ramificam em pequenos ductos intercalares que terminam nos ácinos (Figura 4). Os ácinos podem ser constituídos por células serosas, mucosas ou seromucosas e células mioepiteliais (Wang *et al.*, 1994; Ellis *et al.*, 2001). As células serosas contêm grânulos secretores densos e são especializadas na síntese, armazenamento e secreção proteica; a secreção das células mucosas possui um conteúdo menos enzimático e com maior teor em glicoproteínas (Leite, 2006). As células mioepiteliais são células contrácteis que estão associadas às células secretoras dos ácinos e dos ductos pela sua superfície externa, auxiliando na libertação das secreções (Garrett *et al.*, 1998). Um dos principais critérios para a identificação destas células em glândulas salivares é a presença de filamentos de actina e miosina, estruturas típicas das fibras musculares lisas.



**Figura 4** - Esquema representativo da unidade básica da glândula salivar (Caseiro, 2007)

A glândula parótida é um órgão par localizado junto ao ângulo da mandíbula. É a principal glândula salivar e a de maior dimensão, produzindo cerca de 25% da saliva total. Os ácinos nesta glândula são constituídos por células serosas piramidais, especializadas na síntese e armazenamento de proteínas (Ellis, 1991; Wang, 1994).

A glândula sublingual é também um órgão par, situado de ambos os lados da linha média da língua. Os ácinos são constituídos por células mucosas, que segregam pouco conteúdo enzimático e glicoproteínas com grandes cadeias de hidratos de carbono, que caracterizam o muco (Wang, 1994; Gonçalves e Bairos, 2007). Contém ainda as chamadas meias luas serosas, que se encontram à volta de alguns ácinos mucosos.

A glândula submandibular, à semelhança das anteriores, é também um órgão par de localização simétrica na face interna de cada ramo horizontal da mandíbula. Os ácinos podem ser serosos, mucosos e seromucosos, apresentando estes últimos um componente celular mucoso e outro seroso (Gonçalves e Bairos, 2007). Nos roedores, o parênquima desta glândula possui um tipo particular de ductos, os ductos granulares, que representam um segmento ductal altamente desenvolvido e contornado. As células destes ductos são caracterizadas por numerosos grânulos serosos que sintetizam e segregam um grande número de polipéptidos biologicamente activos, nomeadamente factores de crescimento (Karabushi, 2009).

## 1.4. Saliva e diabetes

Os custos económicos associados à hiperglicémia são substancialmente elevados. A detecção precoce pode prevenir ou atrasar o desenvolvimento de diabetes e outras complicações relacionadas com a doença. Assim, a pesquisa de pré-diabetes nas populações pode ser economicamente mais viável do que após a doença se estabelecer (Jaakko, 2001).

Nos últimos anos, o estudo da saliva em diabéticos tem vindo a progredir. Inicialmente, no estudo da saliva associada à diabetes começou por se dar mais atenção ao volume total e à taxa de secreção, na medida em que a xerostomia, ou sensação de boca seca, é uma das queixas mais comuns por parte dos pacientes diabéticos (Moore *et al.*, 2001). A maior parte dos estudos realizados, quer utilizando modelo animal (Watanabe *et al.*, 2001; Fedirko *et al.*, 2006), quer em humanos (Dodds *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001; Khovidhunkit *et al.*, 2009) referem uma redução no volume de saliva produzido. Com o avanço de técnicas como a proteómica e a utilização da saliva como meio de diagnóstico de várias patologias, o estudo da saliva de diabéticos passou a ganhar importância na procura de biomarcadores da doença.

De entre os vários estudos em que a concentração proteica da saliva foi comparada, alguns não observaram diferenças entre diabéticos e indivíduos saudáveis, enquanto outros referem aumentos (Lopez *et al.*, 2003). Existem estudos que indicam que a permeabilidade da membrana basal da glândula parótida é maior em diabéticos, o que resulta num aumento da percolação de componentes como a glicose, a albumina e outras proteínas provenientes do sangue, aumentando assim os seus níveis na saliva (Mealey, 2003). Há ainda estudos que referem concentrações menores em indivíduos diabéticos (Yavuzyilmaz, 1996; Arati, 2010). Um estudo realizado recentemente (Cabras *et al.*, 2010) mostra alterações na composição quantitativa proteica da saliva entre crianças diabéticas (tipo I) e não diabéticas. Neste caso, para além de alterações a nível da quantidade de proteínas total, os autores observaram diferenças a nível da expressão de tipos particulares de proteínas. Proteínas como estaterinas, PRPs e histatinas foram encontradas em menor quantidade na saliva de diabéticos, sendo referido que isso poderia comprometer a capacidade de cicatrização da cavidade oral.

Tal como acontece no caso da concentração proteica da saliva, também para a concentração e actividade enzimática da amilase salivar há estudos com resultados

opostos. Por exemplo, foi observada uma diminuição na produção de amilase salivar em ratos cuja diabetes foi induzida pela administração de estreptozotocina, situação esta que foi revertida pela administração de insulina (Kim, 1990). Por outro lado, alguns estudos referiram aumentos na concentração e actividade da amilase salivar (Dodds e Dodds, 1997; Aydın, 2007), enquanto outros não encontraram diferenças (Newrick *et al.*, 1991). Os níveis de amilase na saliva podem assim ser um importante alvo de estudo, uma vez que esta é a proteína secretada em maior quantidade pelas glândulas parótidas (Nater, 2009). Deste modo, uma alteração na sua concentração salivar pode ser indicadora de alterações no funcionamento dessas mesmas glândulas.

Para além dos estudos efectuados a amostras de saliva, também a nível das glândulas salivares há alguma informação na bibliografia. Há estudos que mostram alterações na histologia e morfologia das glândulas salivares parótidas e submandibulares (revisto em Anderson, 1998). Apesar de serem referidas alterações em ambas, muitos dos estudos apontam para alterações mais marcadas nas glândulas submandibulares, o que é justificado pelo facto destas últimas contribuírem com a maior percentagem para a saliva mista basal (Dodds *et al.*, 2000). Uma das alterações mais referidas, a nível da histologia das glândulas salivares, é a acumulação de gordura nos ácinos, particularmente nas parótidas. A causa desta acumulação não está ainda bem compreendida, tendo sido apontadas várias explicações possíveis (revisto em Anderson, 1998), as quais estão relacionadas, ou com alterações ao nível do transporte de glucose para o interior das células, e consequentes alterações na forma de obtenção de energia; e/ou, com uma secreção de proteínas comprometida (característica da diabetes), e consequente redução na necessidade de utilização de lípidos para o “empacotamento” de proteínas secretoras.

No entanto, todas estas alterações referidas na bibliografia foram encontradas associadas aos casos de DM, não se tendo encontrado estudos que confirmem a existência das mesmas alterações em situações de pré-diabetes. O objectivo geral deste trabalho é procurar a existência de alterações na função salivar em ratos intolerantes à glicose, no que respeita à concentração proteica total da saliva, morfologia e morfometria das glândulas salivares maiores e expressão da amilase salivar na saliva e glândulas salivares. A utilização de um modelo animal de pré-diabetes tem a vantagem de permitir o estudo das alterações numa fase prévia ao desenvolvimento da patologia, o que poderá ter interesse para uma melhor compreensão desta e/ou para uma acção preventiva em fases precoces.



## **2. Métodos**

### **2.1 Animais**

Seis fêmeas provenientes da estirpe Wistar, seleccionadas ao longo de 7 gerações pela sua intolerância à glicose (GIR - *Glucose Intolerant Rat*) e seis fêmeas da estirpe Wistar, normoglicémicas (grupo controlo), com 3 meses de idade foram utilizados neste estudo.

Os ratos foram mantidos com livre acesso a água e alimentos (*dieta standard* para ratos; SAFE tipo A04), num sistema com temperatura 23-24°C e humidade 60% regulada, num ciclo claro/escuro de 12/12h. Estes procedimentos foram supervisionados por um cientista treinado pela Federação de Laboratórios Europeus de Ciência Animal e em conformidade com a lei portuguesa (Portaria1005/92) a qual segue as recomendações da União Europeia no que diz respeito à regulamentação da experimentação em animais de laboratório.

### **2.2 Teste de tolerância à administração de glicose oral**

De modo a confirmar a intolerância à glicose por parte das fêmeas constituintes do grupo GIR, os animais foram submetidos a um teste com administração de glicose oral. As fêmeas foram deixadas em jejum (16 a 18 horas). Os níveis de glicose circulante foram determinados, através de um glicómetro (Accu-Chek Advantage, Roche) e tiras teste (Accu-Chek, Roche), tendo o sangue sido recolhido da cauda. A primeira medição foi feita em jejum. Imediatamente a seguir cada animal recebeu um *bolus* de glicose (1,75g/Kg de peso vivo, solução de glicose a 25% em água) através de sonda gástrica (de acordo com as regras de manipulação e bem estar animal em vigor). Foram feitas novas determinações da glicemia aos 30, 60, 90 e 120 minutos, de modo a traçar curvas de tolerância.

## 2.3 Recolha de saliva

A recolha de saliva foi feita a ambos os grupos, nos mesmos dias, sob as mesmas condições, entre as 11h e as 13h, tendo os animais acesso a água e alimento nas horas precedentes. A cada animal foi administrado 7mg/Kg peso vivo de pilocarpina (*pilocarpine hydrochloryde*, Sigma, Ref<sup>a</sup> P6503) através de injeção subcutânea. A pilocarpina é um fármaco agonista do sistema nervoso autónomo parassimpático, estimulando a secreção de fluidos; a saliva é assim produzida em maior quantidade, mais fluida e diluída, o que facilita a sua recolha, sem que seja alterado o seu conteúdo proteico (Muenzer, 1979). A saliva mista foi recolhida directamente da boca dos animais por aspiração com uma micropipeta, e imediatamente transferida para *eppendorffs* mantidos em gelo, de modo a minimizar a degradação proteica (Seymor et al., 2010). A duração do efeito da pilocarpina era, em média, de 15 minutos, intervalo durante o qual a saliva foi recolhida.

Após as recolhas, as amostras foram centrifugadas a 10 000g durante 5 minutos, a 4°C, com o objectivo de precipitar quaisquer vestígios sólidos em suspensão, como restos de alimento, células ou outros. O sobrenadante resultante foi recolhido, aliquotado e posteriormente congelado, sendo o precipitado desprezado.

## 2.4 Determinação da concentração proteica das amostras de saliva

Uma vez que não existe um método ideal para todos os tipos de proteínas, no que diz respeito à determinação da concentração proteica, é necessário escolher aquele que melhor se adequa à amostra em estudo. Assim, e de modo a escolher o método mais apropriado para a quantificação da concentração em proteínas salivares totais, foram comparados dois métodos: método de Bradford e o método de Lowry.

A análise pelo método de Bradford é um procedimento espectroscópico usado para medir a concentração de proteína numa solução. Esta análise proteica é colorimétrica, baseando-se na absorvância do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* sob condições ácidas, em que uma forma avermelhada do corante é convertida numa cor

azulada, aquando da ligação às proteínas. A intensidade da cor azul desenvolvida é proporcional à quantidade de proteína ligada.

O método de Lowry combina a reacção de iões cobre com as ligações peptídicas em meio alcalino, com oxidação dos resíduos proteicos aromáticos e simultânea redução do reagente de Folin-Ciocalteu. Assim, a concentração proteica total na amostra é deduzida pela concentração dos resíduos aromáticos que reduzem o reagente de Folin.

Este é um método de elevada sensibilidade, sendo frequentemente utilizado na determinação da concentração proteica de uma grande diversidade de amostras. No entanto, tem como desvantagens requerer um longo tempo de análise e possui ainda absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas.

#### 2.4.1 Método de Bradford

O método foi realizado em microplacas de 96 poços, seguindo as instruções do fabricante. De modo resumido, a solução corante de Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 (Bio-Rad; Ref<sup>a</sup> 500-0006) foi preparado com água mili-Q, numa diluição de 1:4. Para cada placa foi traçada uma curva padrão, a partir de soluções de BSA com concentrações de 50, 100, 200, 350 e 500  $\mu\text{g/mL}$ .

As amostras foram descongeladas em gelo. Por se desconhecer a concentração das amostras, em cada placa foram aplicadas 4 diluições de cada amostra (5x, 10x, 30x e 60x), tendo as mesmas sido preparadas com água mili-Q. Foram aplicados 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição de cada uma das amostras, em triplicado na placa, bem como o mesmo volume de cada uma das diferentes concentrações da solução de BSA, também em triplicado. Posteriormente, pipetaram-se 200 $\mu\text{L}$  da solução de corante diluído para cada poço da placa. Após 10 minutos de incubação, à temperatura ambiente, a leitura das absorvância foi feita no leitor de microplacas (Microplate reader Biotek ELX 800), num comprimento de onda de 630nm. Apesar das recomendações do fabricante indicarem leituras a 595 nm, na indisponibilidade de filtro para leitura a esse comprimento de onda, a leitura foi feita a um comprimento de onda para o qual foi previamente observado existir um pico de absorvância no espectro. A sensibilidade do método não foi afectada por esta alteração, obtendo-se a relação linear esperada entre a absorvância e a concentração.

Com os valores médios dos triplicados das absorvâncias obtidas para as diferentes diluições da solução de BSA, traçou-se a curva de calibração, em função da concentração. A partir desta curva, por interpolação, e considerando os respectivos factores de diluição utilizados, estimou-se a concentração proteica de cada amostra.

#### 2.4.2 Método de Lowry

As amostras, previamente descongeladas em gelo, e sempre mantidas no mesmo durante o seu manuseamento, foram preparadas em NaOH em duplicados, para diluições de 10x e 20x. Em tubos de ensaio, a 600 $\mu$ L de cada amostra adicionou-se 1mL de reagente de Lowry (sulfato de cobre:tartarato de sódio e potássio:carbonato de sódio, na proporção 1:1:98), agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente, sem agitação, durante 10 minutos. Seguidamente, adicionou-se a cada tubo 100 $\mu$ L de reagente de Folin (Folin:água bi-destilada, na proporção 1:1), agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Por fim, procedeu-se à leitura da absorvância das amostras num espectrofotómetro (Hitachi), a um comprimento de onda de 720nm. Para traçar a curva padrão, foram preparadas 5 diluições de BSA em NaOH, com concentrações de 50, 75, 100, 150 e 200  $\mu$ g/mL. A partir desta curva, por interpolação e tendo em conta o factor de diluição, a quantidade de proteína de cada amostra foi calculada.

### **2.5 Separação das proteínas por electroforese SDS-PAGE**

A electroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) é uma técnica relativamente simples e de alta sensibilidade, usada para separar proteínas de acordo com o comprimento da cadeia polipeptídica ou do peso molecular, o qual em presença de SDS, e através da aplicação de um campo eléctrico, determina a sua mobilidade electroforética.

Para a corrida electroforética foi utilizado o sistema Mini-Protean 3 cell (Bio-Rad). Prepararam-se géis SDS-PAGE com 12% poliacrilamida, de dimensão de 8 cm por 10 cm e 1 mm de espessura. A solução para preparar o gel de resolução consistiu em 5mL de Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, 200  $\mu$ l de SDS 10% (m/v), 8mL de solução

acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 6,8mL de água bidestilada, 150 $\mu$ L de APS e 10 $\mu$ L de TEMED. Esta solução foi aplicada nas cassetes, evitando a formação de bolhas de ar, até cerca de 1 cm abaixo do limite superior do vidro, e sobre ela uma camada de água bidestilada, de modo a prevenir o contacto com o ar e a permitir a polimerização. Após a polimerização foi aplicada, no topo do gel de resolução, a solução respeitante ao gel de concentração [2mL de Tris-HCl 0,5, pH 6.8, 80 $\mu$ L de SDS 10% (m/v), 4,86mL de água bidestilada, 1,06 de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 48 $\mu$ L de APS e 8,8 $\mu$ L de TEMED]. Sobre esta colocou-se o pente de 10 poços de 1 mm. Após polimerização, retiraram-se os pentes e procedeu-se à montagem do suporte de géis na tina, enchendo ambos os reservatórios (superior e inferior) com tampão de corrida [0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS], de modo a que ambas as extremidades dos géis ficassem em contacto com o tampão.

Para preparação das amostras foram usados volumes correspondentes a 10  $\mu$ g de proteína, de modo a aplicar a mesma quantidade em cada poço. As amostras foram misturadas com tampão de amostra (0,125M Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS (m/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, quantidade vestigial de azul de bromofenol) e aquecidas num banho seco, a 95°C, durante 5 minutos, para que ocorresse a desnaturação proteica. Terminado este tempo, foram colocadas imediatamente em gelo, e procedeu-se à sua aplicação nos poços do gel. Em cada um dos géis foi aplicado um marcador de massas moleculares (Dual Color; Bio-Rad, Ref<sup>a</sup> 161-0324), num dos poços, num volume de 5  $\mu$ L.

A corrida electroforética ocorreu a uma voltagem constante de 140V, durante aproximadamente 1h30min, até a frente de corrida atingir o final do gel. Terminada a corrida electroforética, os géis foram retirados cuidadosamente das cassetes de vidro.

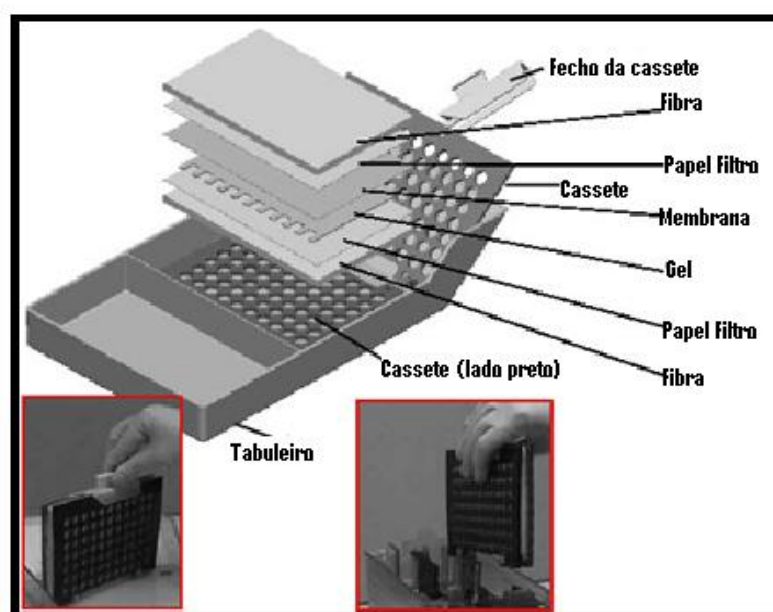
Os géis foram corados com CBB R-250 (0,1% CBB-R-250 em 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético) e descorados numa solução de 20% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético.

As imagens foram obtidas através de digitalização num *scanner* (HP ScanJet 3400C). A análise das imagens foi feita com recurso ao *software* TotalLab Quant. Este *software* permite a análise do volume relativo das bandas, corrigindo pequenas diferenças existentes entre as quantidades de proteína corridas em cada lane e permitindo, assim, uma mais correcta comparação intra- e inter-géis, minimizando erros devido a alguma variabilidade inerente à técnica.

## 2.6 Imunodeteccção de proteínas – Western Blotting

Esta técnica baseia-se na transferência de proteínas separadas em gel para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF (difluoreto de polivilideno) e a sua detecção baseada na especificidade antigénio-anticorpo. Esta permite que a proteína alvo seja detectada por fluorescência, entre uma mistura complexa de proteínas.

Para a preparação e corrida dos géis de poliacrilamida, repetiu-se o procedimento anteriormente descrito, alterando apenas a espessura para 0,75mm e a quantidade de proteína aplicada em cada lane para 3 µg. Terminada a corrida, procedeu-se à activação das membranas de PVDF, mergulhando-as em metanol durante 5 segundos, lavando em seguida em água destilada, durante 5 minutos, e posteriormente em tampão de transferência, durante 10 minutos. De seguida, num tabuleiro com tampão de transferência, procedeu-se à montagem da *sandwich* nas cassetes, de acordo com a ordem apresentada na Figura 5, evitando a formação de bolhas de ar, de modo a que o gel e a membrana ficassem totalmente em contacto.



**Figura 5** - Representação esquemática do modo de execução da *sandwich* na cassette (adaptado de Patnaik, 2004).

As cassetes foram colocadas na tina juntamente com a unidade de arrefecimento e um agitador magnético, de modo a manter a temperatura e a distribuição iónica constantes. Por fim, encheu-se a tina com tampão de transferência, colocou-se em cima

de uma placa de agitação e ligou-se à fonte de alimentação, programando uma voltagem constante de 150V, durante 1 hora.

Terminada a corrida, as membranas foram coradas com corante Ponceau durante 10 minutos, de modo a visualizar as bandas e a confirmar a transferência para a membrana. Seguidamente, as membranas foram colocadas em tampão de bloqueio [leite em pó dissolvido em TBS-T 5% (m/v)], durante duas horas, em agitação e posteriormente incubadas em anticorpo anti-amilase (Sc-46657, Santa Cruz Biotechnology), numa diluição de 1:200 em TBS-T, *overnight* a 4°C, em agitação. Após incubação com o anticorpo primário, as membranas foram submetidas a três lavagens, de 15 minutos cada [leite em pó dissolvido em TBS-T, 0,5% (m/v)], com agitação, sendo em seguida incubadas em anticorpo secundário (anti-mouse, diluição 1:10000) durante duas horas, à temperatura ambiente, em agitação. Após a incubação, procedeu-se novamente às lavagens, tal como foram descritas anteriormente.

As membranas foram retiradas da solução de lavagem e o excesso de líquido retirado com auxílio de papel de filtro. Numa placa de plástico, colocou-se o substrato (fosfatase alcalina) em pequenas gotas justapostas, numa área equivalente à área da membrana. A membrana foi colocada invertida em contacto com o substrato, evitando a formação de bolhas. Retirou-se alguns segundos depois, e removeu-se o excesso de reagente com papel de filtro. Este procedimento realizou-se mantendo a sala escura. A aquisição de imagem foi feita num transiluminador (Bio-Rad). A análise das imagens adquiridas foi feita com recurso ao *software* Quantity-one (Bio-Rad).

## **2.7 Análise histológica e morfométrica das glândulas salivares**

Os animais foram sacrificados por anestesia de éter seguida de punção cardíaca. As glândulas salivares foram imediatamente recolhidas e fixadas em formaldeído neutro a 10% e tamponado (pH=7,4), durante 24h. Posteriormente, o material foi processado por técnicas histológicas de rotina, como a inclusão em parafina, corte com 5µm de espessura em micrótomo rotativo e coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para observação da estrutura geral e avaliação histomorfométrica.

As secções das glândulas salivares foram observadas através de microscopia fotónica com um microscópio Nikon Eclipse 600 (Nikon, Kanagawa, Japan). Para cada

animal, foram recolhidas dez fotomicrografias digitais, de áreas escolhidas aleatoriamente, de cada uma das glândulas salivares, com câmara Nikon DN100 (Nikon, Kanagawa, Japan), tendo as glândulas sido observadas e fotografadas com uma ampliação de 100x. Para cada animal, as áreas e os perímetros de, pelo menos 1500 ácinos das glândulas parótida, sublingual e submandibular, foram medidos através do *software* SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA). Apenas as estruturas histológicas cujos limites eram claramente definidos foram consideradas na medição.

## 2.8 Imuno-histoquímica das glândulas salivares

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando os anticorpos primários contra  $\alpha$ -amilase (Sc-46657, Santa Cruz Biotechnology) e actina/músculo liso (RB-9010, Neomarkers) pelo método da Streptavidina-biotina-peroxidase (UltraVision Sistema de Detecção de Kit, NeoMarkers, USA, ref<sup>a</sup> TP-015-HD), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente: secções de 5  $\mu$ m de espessura, dos mesmos blocos da análise histológica, foram estendidas em lâminas de vidro de 75x25 mm, tratadas com polilisina, desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em graduações decrescentes de álcool até água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol (1 parte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%, para 9 partes de metanol absoluto), durante 15 minutos em temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*; pH 7,4), três vezes, por dois minutos. Antes da incubação com o anticorpo primário contra  $\alpha$ -amilase, os cortes foram pré-tratados para recuperação antigénica, em solução tampão citrato (pH 6,0), a 98°C durante 20 minutos, após o que foram arrefecidos, durante 20 minutos, à temperatura ambiente e lavados em PBS, três vezes, por dois minutos. Os cortes, para serem utilizados com o anticorpo anti-actina não sofreram qualquer pré-tratamento. Para a diminuição das ligações inespecíficas (*background*), os cortes foram tratados com a solução de bloqueio durante 5 min à temperatura ambiente, após o que foram incubados, em câmara húmida, com os respectivos anticorpos primários (anti  $\alpha$ -amilase, na diluição de 1:500; anti-actina, na diluição de 1:50), durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com anticorpo secundário

biotinilado por 15 minutos, em câmara húmida e temperatura ambiente. De seguida, foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase por mais 15 minutos em câmara húmida e temperatura ambiente, sendo lavados novamente em PBS, três vezes por dois minutos, e submetidos à revelação com o cromógeno castanho [DAB, Diaminobenzidina], por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 1-2 minutos e desidratados em graduações de álcool, clarificados em xilol e montados com Entellan (Merck, nº. 107961). Para a interpretação dos resultados foram incubadas secções adjacentes como controlos negativos: (a) sem o anticorpo primário e (b) com soro normal (concentração semelhante à do anticorpo primário).

Relativamente à expressão das proteínas as lâminas foram também examinadas em microscópio fotónico Nikon Eclipse 600 sendo as imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100. A intensidade da coloração e a localização de células/estruturas imunorreactivas foram avaliadas em, pelo menos, uma secção de cada glândula por animal, por um observador que desconhecia o grupo a que pertenciam os animais. A imunocoloração foi avaliada de forma qualitativa de acordo com a seguinte escala: - (negativo); + (imunomarcção fraca); ++ (imunomarcção moderada); +++ (imunomarcção forte).

## **2.9 Análise estatística dos dados**

Todos os dados foram analisados para a normalidade (teste Kolmogorov-Sminorff) e homocedasticidade (teste Levene). Os dados dos pesos e glicemia apresentavam distribuição normal, tendo sido usada análise de variância (one-way ANOVA) para avaliar as diferenças entre grupos, no que diz respeito aos pesos e GLM (*general-linear model*) ANOVA para avaliar as diferenças entre grupos e, dentro dos diferentes grupos, ao longo das várias recolhas. Os dados relativos às concentrações em proteína total das várias amostras de saliva, bem como a percentagem de volume das bandas dos géis corados com CBB-R250 e das membranas imunomarcadas para a amilase salivar, apresentavam distribuição normal, tendo as diferenças entre os diferentes grupos sido avaliada através de *one-way* ANOVA. No que diz respeito aos dados relativos à análise histomorfométrica das glândulas salivares (áreas e perímetros),

estes não apresentavam nem distribuição normal, nem homocedasticidade. Assim, a análise foi feita através de testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . Toda a análise estatística foi realizada com recurso ao *software* SPSS versão 18.

## 3. Resultados

### 3.1 Intolerância à glicose

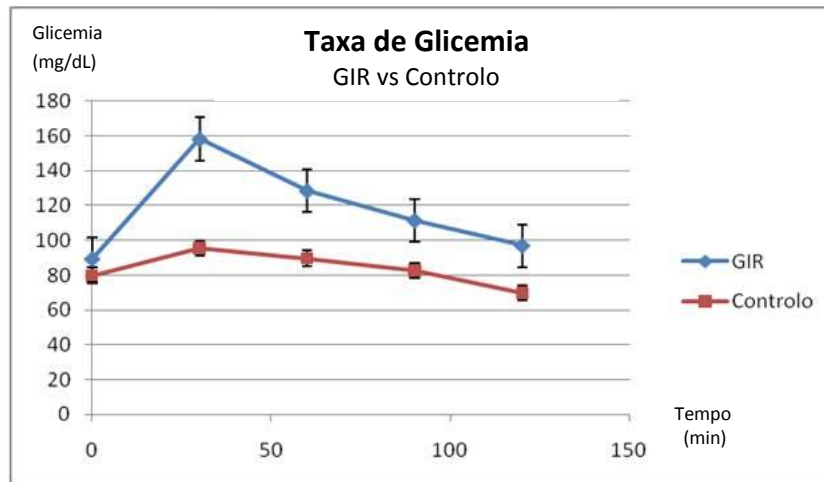
Neste estudo, animais referidos como intolerantes à glicose (GIR, com peso médio de 197,33±4,23g) foram comparados com animais normoglicémicos (com peso médio de 221,83±3,60). De modo a confirmar a condição de pré-diabetes no grupo GIR, os animais foram submetidos à avaliação dos níveis de glicose no sangue.

Em jejum, os valores de glicemia foram semelhantes para os animais de ambos os grupos (Tabela II). Após a toma de glicose (1,75g/Kg peso vivo, por animal) observou-se que os animais do grupo GIR atingem valores de glicemia significativamente mais elevados comparativamente com os animais do grupo controlo, sendo que estas diferenças entre os grupos se continuam a verificar mesmo após 2 horas da toma de glicose. Além desta diferença, verifica-se ainda que a recuperação dos níveis de glicemia para os valores de jejum é ainda significativamente mais lenta no caso do grupo GIR comparativamente ao grupo controlo. Os animais deste último recuperam para valores de glicemia de jejum ao fim de 60 minutos, enquanto que no grupo GIR isto acontece apenas ao fim de 120 minutos (Tabela II e Figura 6).

**Tabela II.** Valores de glicemia (mg/dL) dos animais dos grupos Controlo e GIR em jejum (tempo 0) e após a administração de 1,75g de glicose/Kg de peso vivo (tempos 30, 60, 90 e 120 minutos) (média ± erro padrão)

Tempo	0	30	60	90	120
<b>Controlo</b>	79,83±2,20 <sup>a,c,A</sup>	95,5±1,84 <sup>b,A</sup>	89,17±2,72 <sup>a,b,A</sup>	78,17±1,89 <sup>a,c,A</sup>	69,83±1,51 <sup>c,A</sup>
<b>GIR</b>	89,17±2,44 <sup>a,A</sup>	158,17±7,13 <sup>b,B</sup>	128,33±4,63 <sup>c,B</sup>	111,33±1,58 <sup>d,B</sup>	96,83±5,71 <sup>a,B</sup>

Letras minúsculas iguais significam que não há diferenças significativas entre os vários pontos de recolha; letras maiúsculas iguais significam que não existem diferenças significativas entre os dois grupos experimentais. As diferenças foram consideradas como significativas para P<0,05



**Figura 6** - Curvas médias de glicemia dos grupos GIR e Controlo. Eixo xx: tempo em minutos; eixo yy: glicemia em mg/dL

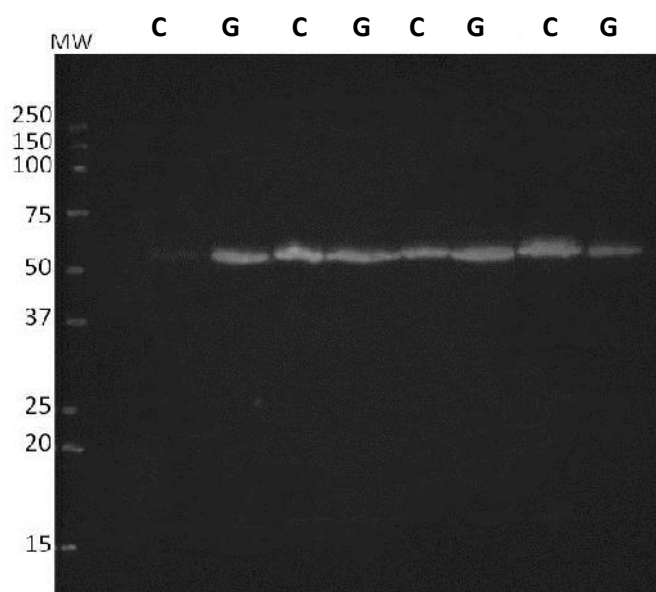
### 3.2 Concentração Proteica

Após comparação dos métodos de Lowry e Bradford, para determinação da concentração em proteína total das amostras de saliva, verificou-se que, apesar dos valores obtidos serem diferentes entre os dois métodos, ambos se podem aplicar a este tipo de amostras. Verificou-se que as amostras cujos valores de concentração obtidos através de um dos métodos eram mais elevados, também apresentavam valores mais elevados, quando determinados pelo outro método (Anexo I, Tabela V). A diferença entre os valores obtidos já era de esperar, na medida em que os métodos se baseiam em princípios diferentes, como foi explicado na secção referente aos materiais e métodos. Tendo em conta o que foi referido, as concentrações proteicas das amostras de saliva mista recolhidas após estimulação com pilocarpina foram determinadas pelo método de Bradford, dada a facilidade de execução do mesmo e o facto de representar uma poupança de amostra.

Os valores do conteúdo em proteína total das amostras estão representados na tabela VI, no anexo I. Observou-se alguma variabilidade entre os diferentes indivíduos para este parâmetro. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração proteica total entre os grupos Controlo e GIR, cujos valores médios foram  $813,49 \pm 153,33 \mu\text{g/mL}$  e  $1252,99 \pm 246,82 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Mais detalhes acerca da análise estatística destes dados encontram-se no anexo I, figura 17.

### 3.3 Western Blot

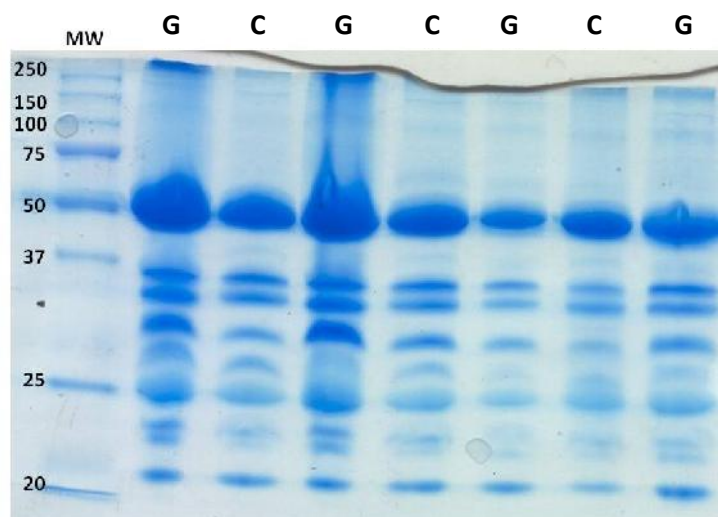
Através de imunomarcção da membrana, reconheceu-se uma banda com uma massa molecular aparente de 53,1 kDa como sendo a  $\alpha$ -amilase salivar. Fazendo a análise semi-quantitativa das respectivas bandas, com recurso ao *software* Quantity One (Bio-Rad), não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, para a banda correspondente à  $\alpha$ -amilase.



**Figura 7** - Imagem da membrana revelada por Western Blot com marcação para a  $\alpha$ -amilase. MW: Marcador de peso molecular; C: Indivíduos normoglicémicos; G: Indivíduos pré-diabéticos

### 3.4 SDS-PAGE

Os géis SDS-PAGE corados com CBB-R250 foram analisados através do *software* TotalLab Quant (anexo II). Também neste caso se observou que os grupos controlo e GIR não apresentam diferenças significativas para a percentagem de volume da banda de massa molecular aparente de 53,1 kDa correspondente à  $\alpha$ -amilase (anexo II, tabela VII). No entanto, é de frisar que há alguma variabilidade entre os indivíduos (quer dentro do grupo controlo, quer dentro do grupo GIR).



**Figura 8** - Imagem do gel SDS Page corado com CBB R-250. MW: Marcador de massas moleculares; G: Animais pré-diabéticos; C: Animais normoglicêmicos

### 3.5 Análise histológica das glândulas salivares

A análise histomorfométrica das glândulas salivares maiores mostra a existência de algumas diferenças entre os ratos controle e os ratos do modelo animal em estudo.

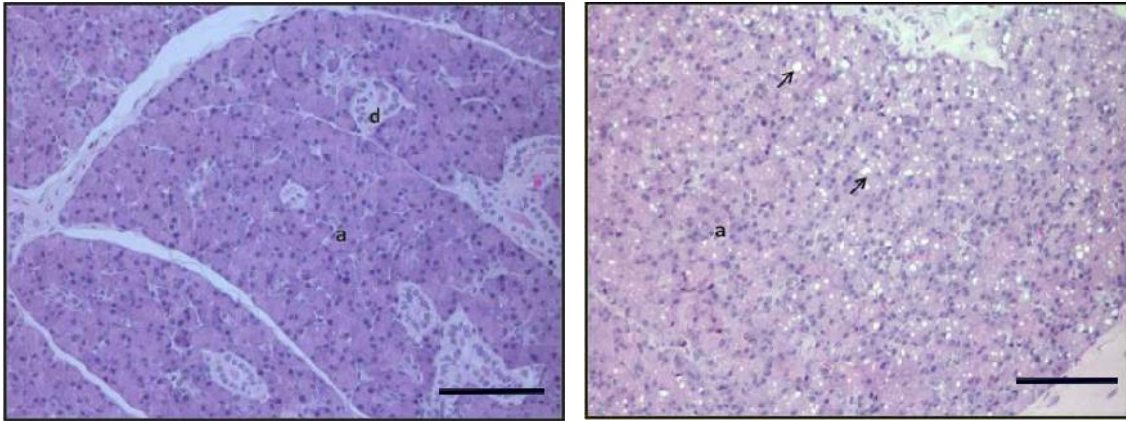
Nas três glândulas estudadas, parótida, submandibular e sublingual, observaram-se valores de área e perímetro acinares significativamente mais elevados nos animais do grupo GIR, comparativamente ao grupo controle (tabela III; figuras 9, 10 e 11; anexo III)

Tabela III: Histomorfometria dos ácinos das glândulas salivares maiores para os dois grupos de animais em estudo (pixéis, média  $\pm$  erro padrão)

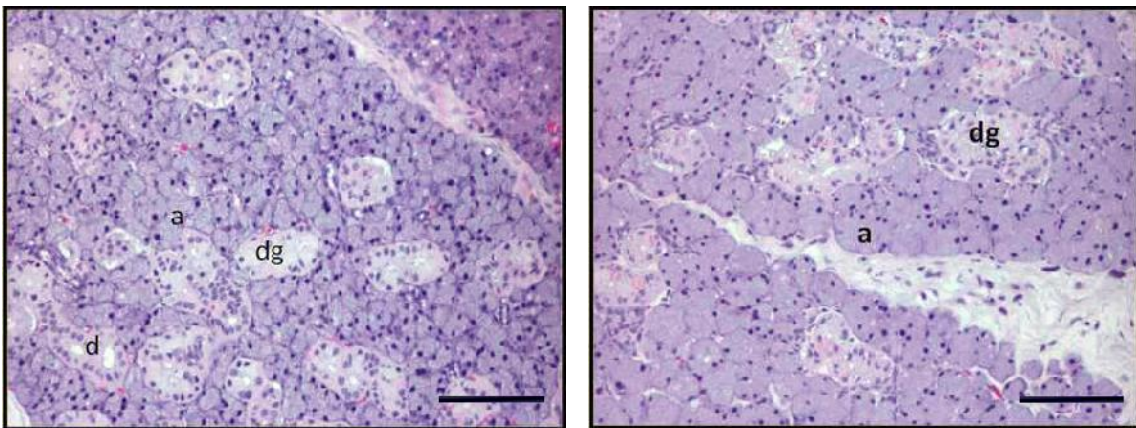
Grupo	Parótida		Submandibular		Sublingual	
	Área	Perímetro	Área	Perímetro	Área	Perímetro
Controle	3884,72	248,83	4450,99	266,31	11527,53	417,43
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	20,28 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	22,16 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>	94,90 <sup>a</sup>	1,78 <sup>a</sup>
GIR	4536,80	266,43	5148,98	282,89	12538,9	438,62
	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
	24,39 <sup>b</sup>	0,75 <sup>b</sup>	27,04 <sup>b</sup>	0,99 <sup>b</sup>	89,89 <sup>b</sup>	1,70 <sup>b</sup>

Letras iguais significam que não há diferenças significativas entre os grupos para cada um dos parâmetros (área e perímetro) em cada uma das glândulas; As diferenças foram consideradas como significativas para  $P < 0,05$

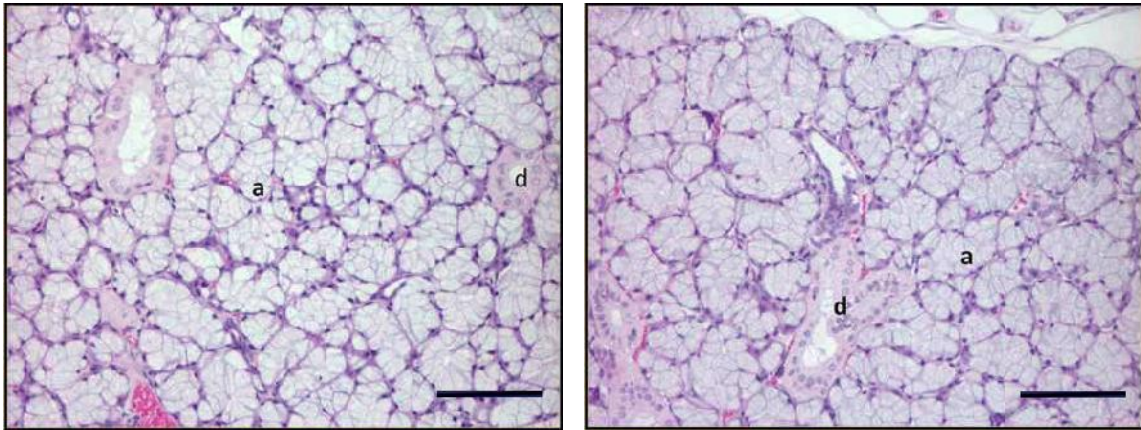
Assim, observou-se que os animais do grupo GIR apresentam, quer ácinos serosos, quer ácinos mucosos, de maiores dimensões, comparativamente aos animais do grupo controle. Além disso, pode constatar-se também a presença de uma maior acumulação de lípidos no interior dos ácinos serosos das glândulas parótidas dos animais pré-diabéticos, em detrimento dos animais normoglicêmicos.



**Figura 9.** Glândulas parótidas. Controle (esquerda) e GIR (direita). É visível a acumulação de lípidos nas glândulas parótidas dos animais do grupo GIR (setas), havendo também um aumento da área e perímetro acinares; **a** – ácinos; **d** – ductos intralobulares (100X, H&E, barra - 100 $\mu$ m).



**Figura 10.** Glândulas submandibulares. Controle (esquerda) e GIR (direita), em que as áreas e perímetros acinares estão aumentados nos animais GIR, comparativamente aos animais do grupo controle; **a** – ácinos; **d** – ductos estriados; **dg** – ductos granulares (100X, H&E, barra - 100 $\mu$ m).



**Figura 11.** Glândulas sublinguais. Controlo (esquerda) e GIR (direita), em que as áreas e perímetros dos ácinos mucosos estão aumentados nos animais GIR, comparativamente aos animais do grupo controlo; **a** – ácinos; **d** – ductos intraglandulares (100X, H&E, barra - 100 $\mu$ m).

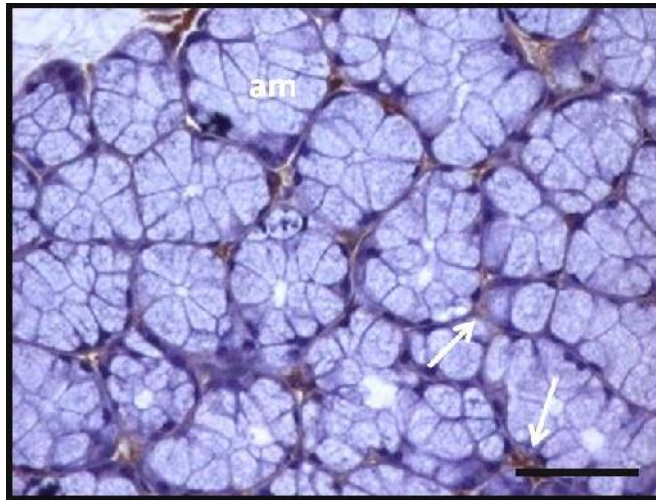
### 3.6 Imunohistoquímica das glândulas salivares

As glândulas salivares foram marcadas com anticorpos anti -amilase e anti actina, separadamente. A utilização de um anticorpo para a actina do músculo liso teve como principal objectivo identificar e comparar a expressão de células mioepiteliais entre os dois grupos em estudo, as quais participam no processo de secreção de saliva.

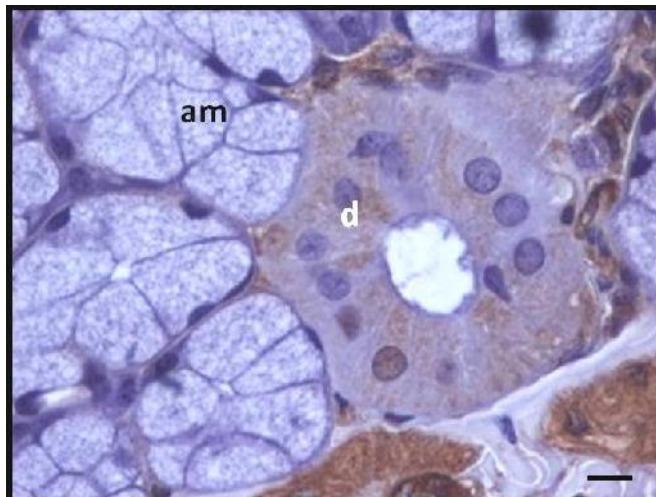
#### Actina

No que diz respeito ao anticorpo actina, não se verificou marcação no interior dos ácinos, em nenhuma das glândulas salivares analisadas. No entanto, observaram-se células alongadas marcadas, à superfície dos ácinos (Figura 12), as quais dizem respeito a células mioepiteliais. Também a nível dos ductos intralobulares se observa marcação, desta vez no citoplasma das células (Figura 13). Quando comparadas as três glândulas, pode dizer-se que a marcação das células mioepiteliais, aumenta de intensidade na seguinte ordem: glândula parótida, glândula submandibular e glândula sublingual.

Quando comparadas as glândulas entre os grupos Controlo e GIR, não se verificaram quaisquer diferenças na quantidade ou distribuição de células mioepiteliais.



**Figura 12.** Imunomarcção para a actina, evidenciada pela cor castanha, em secção de de glândula sublingual. São visíveis células mioepiteliais em redor dos ácidos mucosos (**am**, setas) [200X, Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, barra – 50  $\mu$ m].



**Figura 13.** Imunomarcção para a actina, evidenciada pela cor castanha, em secção de glândula sublingual, com marcada expressão no citoplasma das células dos ductos; **am** - ácino mucoso; **d** - ducto [400X, Contracoloração com Hematoxilina de Meyer, barra - 10  $\mu$ m].

### -amilase

Nas marcações efectuadas para a -amilase foi possível encontrar diferenças, tanto entre as diferentes glândulas como entre os grupos (Tabela IV; Figuras 14, 15 e 16). Na glândula parótida foi notória uma marcação bastante intensa no citoplasma dos ácidos (Tabela IV; Figura 14).

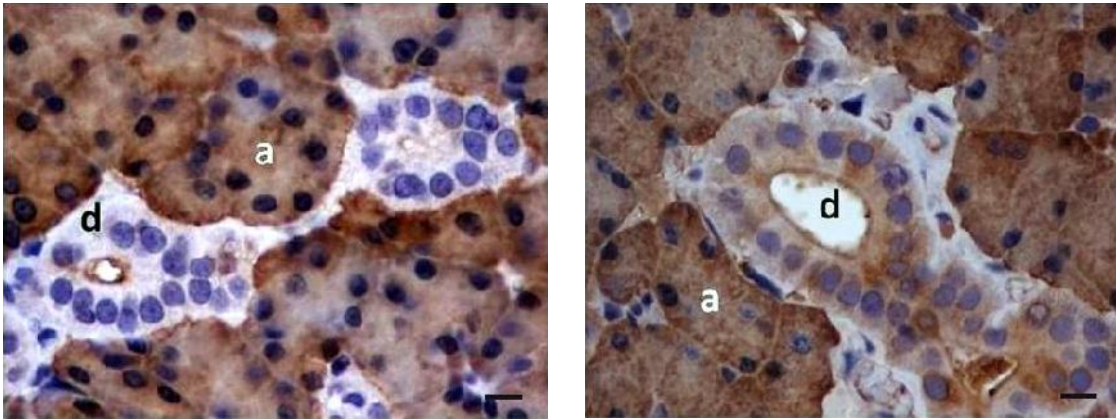
**Tabela IV.** Intensidade da marcação para a  $\alpha$ -amilase nas diferentes estruturas das glândulas<sup>1</sup>

Glândula	Estrutura	Intensidade	
		Controlo	GIR
Parótida	Ácinos	+++	+++
	Ductos intralobulares	+	++
Submandibular	Ácinos mucosos	-	-
	Ductos granulares	+	++
	Ductos estriados	-	±
Sublingual	Ácinos mucosos	-	-
	Meias luas serosas	++	++
	Ductos intralobulares	+	+

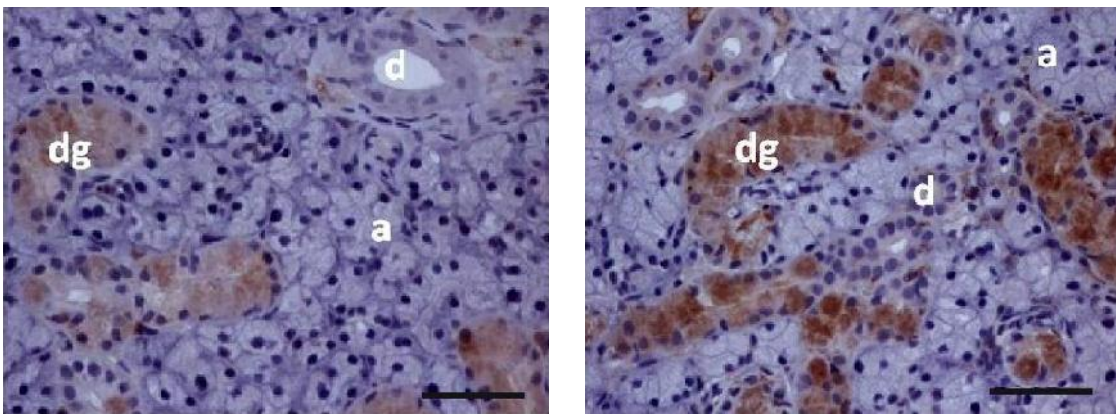
<sup>1</sup> sem marcação (-); marcação muito reduzida (±); marcação reduzida (+); marcação moderada (++); marcação intensa (+++)

Já no que diz respeito aos ácidos seromucosos das glândulas submandibulares e aos ácidos mucosos das glândulas sublinguais, não se observa marcação para a diluição de anticorpo utilizada. Os ductos granulares das glândulas submandibulares apresentaram-se com marcação mais intensa em relação às restantes estruturas destas glândulas (Tabela IV; Figura 15). A nível das glândulas sublinguais, observou-se marcação principalmente a nível das meias-luas serosas (Tabela IV; Figura 16).

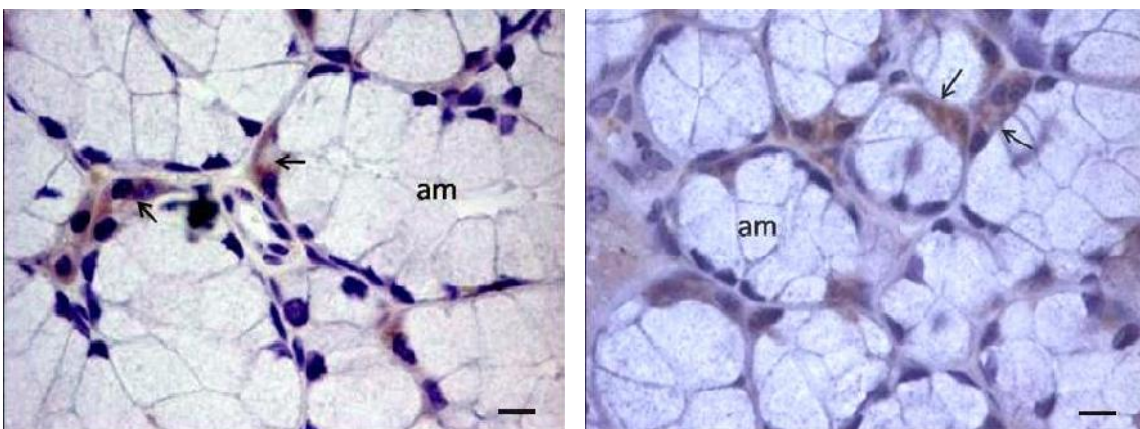
Quando comparámos os grupos em estudo, observámos que o citoplasma dos ductos estriados das glândulas parótidas apresentava uma marcação mais intensa no grupo GIR, comparativamente ao grupo controlo (Tabela IV; Figura 14). Também a nível dos ductos granulares das glândulas submandibulares observou-se uma marcação ligeiramente mais intensa no grupo GIR, comparativamente ao grupo controlo (Tabela IV; Figura 15). Além destas, mais nenhuma estrutura em nenhuma das glândulas apresentou diferenças entre os grupos.



**Figura14.** Imunomarcaco para  $\alpha$ -amilase, evidenciada pela cor castanha, em seco de glndula partida (controle,  esquerda; GIR  direita). Pormenor de ducto intralobular. **d** – ductos; **a** – cinos serosos [400X, Contracolorao com Hematoxilina de Meyer, barra – 10  $\mu$ m].



**Figura15.** Imunomarcaco para  $\alpha$ -amilase, evidenciada pela cor castanha, em seco de glndula submandibular (controle,  esquerda; GIR  direita). **a** – cinos; **d** – ductos; **dg** – ductos granulares [200X, Contracolorao com Hematoxilina de Meyer, barra – 50  $\mu$ m].



**Figura 16:** Imunomarcaco para  $\alpha$ -amilase, evidenciada pela cor castanha, em seco de glndula sublingual (controle,  esquerda; GIR  direita). **am** – cinos mucosos; meias luas serosas (setas) [400X, Contracolorao com Hematoxilina de Meyer, barra – 10  $\mu$ m].



## 4. Discussão

O objectivo do presente trabalho foi avaliar a existência de alterações na função salivar num estado prévio ao desenvolvimento de Diabetes Mellitus, através da utilização de um modelo animal de intolerância à glicose. Ao longo dos últimos anos este modelo animal tem vindo a ser desenvolvido, através de cruzamentos consanguíneos de animais da estirpe Wistar que apresentam, espontaneamente, curvas de tolerância à glicose alteradas. No presente estudo trabalhou-se com animais pertencentes à 7ª geração. Como forma de confirmar a presença de intolerância à glicose, nos indivíduos pertencentes ao grupo GIR, foram determinados os valores de glicemia dos animais, em jejum e após a toma de uma quantidade fixa de glicose.

Os resultados obtidos confirmam os já obtidos para as gerações anteriores. Os animais de ambos os grupos apresentaram valores de glicemia em jejum dentro dos intervalos considerados para a normoglicemia, confirmando que a patologia não está ainda instalada. Mesmo assim, os animais do grupo GIR apresentaram um valor médio de glicemia em jejum superior ao valor apresentado pelo grupo controlo. No entanto, esta diferença não foi significativa. Apesar disso, este valor pode indicar já uma tendência para uma glicemia em jejum elevada, que poderá ser significativa nas próximas gerações da estirpe. Os animais pertencentes ao grupo controlo responderam à ingestão de glicose através de um aumento nos níveis de glicemia, os quais ao fim de 60 minutos já tinham retornado a valores semelhantes aos de jejum, o que significa que houve uma resposta à acção da insulina, secretada em face à ingestão de glicose. Ao fim de 30 minutos da administração do *bolus*, os animais do grupo GIR atingiram valores de glicemia significativamente superiores ao grupo controlo. Estas diferenças entre os grupos ainda se mantinham ao fim dos 120 minutos de duração do teste. Para os animais do grupo GIR a recuperação dos níveis de glicose para valores semelhantes aos de jejum só se observou ao fim de 120 minutos. Estes resultados mostram que estes animais são intolerantes à glicose, e que é provável que apresentem já alguma resistência à insulina e vias metabólicas da glicose alteradas (Weiss *et al.*, 2003), o que faz com que a glicemia atinja valores tão elevados, e se restitua os valores normais muito mais lentamente. Estes dados confirmam a situação de “pré-diabetes” dos animais usados neste trabalho.

No que respeita à quantidade de proteína salivar total não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. Os resultados referidos na bibliografia não são consensuais em relação às alterações induzidas pela diabetes neste parâmetro. Há vários autores que referem concentrações proteicas aumentadas, outros referem concentrações diminuídas e outros ainda não encontraram alterações (Yavuzilmaz, 1996; Lopez *et al.*, 2003; Arati, 2010). Uma possível explicação para esta situação é a heterogeneidade de modelos usados nos estudos. A diabetes tem sido estudada quer em humanos com diabetes tipo I e tipo II, quer em modelos animais, sendo que destes alguns são geneticamente diabéticos, outros com diabetes tipo I induzida e outros com diabetes tipo II. Para além disso, há que ter em conta que os nossos animais não apresentam ainda hiperglicemias em jejum.

No presente trabalho, a  $\alpha$ -amilase salivar foi objecto de estudo, na medida em que esta é uma proteína secretada em quantidades elevadas, tendo diversas funções e sendo um bom indicador da actividade das glândulas salivares, particularmente das glândulas parótidas, as quais são o seu principal local de produção. A  $\alpha$ -amilase é uma enzima que actua na digestão, catalisando a hidrólise de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1;4) presentes no amido dos alimentos ingeridos. É sabido que indivíduos intolerantes à glicose e indivíduos diabéticos, têm dificuldades em manter os níveis de glicemia mais ou menos constantes. Desta forma, há alguma necessidade por parte destes de uma ingestão menos espaçada no tempo, de modo a manterem os níveis de glucose. Assim, podemos especular que alterações na concentração de amilase salivar produzida poderiam ter um papel importante em indivíduos diabéticos. Por exemplo, a síntese e secreção de uma maior quantidade de amilase salivar poderia ajudar numa mais rápida digestão do amido, a nível da cavidade oral, podendo este ser mais rapidamente absorvido.

No que respeita à expressão da amilase salivar, não se observaram diferenças entre os grupos. Este facto verificou-se tanto através da análise semi-quantitativa das imagens obtidas pela imunomarcagem (Western Blot) para o anticorpo da amilase, como por comparação da percentagem de volume das bandas coradas com CBB-R250 correspondentes a essa proteína. Como já foi referido, os diversos estudos delineados no sentido de procurar alterações proteicas na saliva de diabéticos têm tido resultados contraditórios: tal como para a concentração em proteína total, também no caso da amilase alguns estudos apontam para que a sua expressão esteja aumentada (Dodds e Dodds, 1997; Aydın, 2007), outros para que esteja diminuída (Anderson e Bevan, 1992;

Lopez *et al.*, 2003; Mahay *et al.*, 2004) e outros ainda para que não haja diferenças (Newrick *et al.*, 1991). Mais uma vez, estas diferenças podem dever-se ao facto de, nos diversos estudos, se trabalhar em condições diferentes, tanto no que respeita ao modelo animal como ao tipo de diabetes. Por outro lado, e continuando com a linha de raciocínio de que uma maior produção de amilase poderá significar uma maior existência de açúcares livres e absorvíveis, a ausência de diferenças nos animais pertencentes ao grupo GIR poderia significar que estes animais ainda não apresentam alterações que justifiquem uma necessidade aumentada de uma maior degradação do amido. Para além disso, há que ter em conta as limitações nas técnicas utilizadas. A electroforese SDS-PAGE permite separar as proteínas unicamente de acordo com as suas massas moleculares. Assim, a banda que foi observada como correspondendo à amilase pode conter outras proteínas com massa molecular idêntica, que “mascarem” os resultados. Uma forma de explorar melhor este assunto seria através da separação de proteínas simultaneamente por massas moleculares e pontos isoeléctricos (electroforese 2D), o que permitiria observar as diferentes isoformas desta proteína, que se sabe existirem (Hirtz *et al.*, 2005).

A avaliação histomorfométrica das glândulas salivares permitiu observar que o perímetro e a área dos ácinos dos animais do grupo GIR são significativamente mais elevados do que nos animais do grupo controlo. Esta hipertrofia acinar encontrada é comum a outros estudos já realizados, em que se associa a sialose a doentes com diabetes tipo II (Scully *et al.*, 2008). A sialose é caracterizada por um aumento de volume principalmente da glândula parótida, embora também seja comum acontecer em todas as glândulas maiores (Negrato e Tarzia, 2010). No entanto, existem outros estudos em que se obtiveram resultados opostos, nos quais, animais com diabetes apresentaram uma redução no volume dos ácinos mucosos e serosos (Noorafshan, 2006). Mais uma vez, a discrepância destes resultados poderá ter ver com o facto de serem usados diferentes modelos de diabetes nos diversos estudos.

Tal como noutros estudos, o ácinos das glândulas parótida e submandibular apresentam acumulações de gotículas de gordura, nos animais do grupo GIR (Mahay *et al.*, 2004). Esta acumulação tem sido explicada com base em duas possibilidades: em primeiro lugar, pensa-se que se pode dever a um aumento dos lípidos dentro das células acinares, como fonte alternativa de obtenção de energia; outra hipótese será uma endocitose não específica, decorrente do aumento dos ácidos gordos livres circulantes

(Anderson e Garrett, 1986). Esta acumulação de gordura pode também ser responsável pela hipertrofia dos ácinos.

A marcação das glândulas salivares com anticorpo anti actina foi feita com o objectivo de analisar a presença de células mioepiteliais nas diferentes glândulas e comparar a sua expressão entre os diferentes grupos em estudo. Verificou-se a presença de um maior número de células mioepiteliais na glândula sublingual, menor na glândula submandibular e menor ainda na glândula parótida. Resultados semelhantes haviam sido já obtidos por outros autores (Nilson e Donath, 1981).

No que respeita à comparação entre os grupos, não se verificaram diferenças entre animais Controlo e GIR na expressão de células mioepiteliais, o que pressupõe que a capacidade de libertação da saliva por parte das células secretoras não se encontre comprometida neste modelo animal para a pré-diabetes. Não encontramos informação na bibliografia acerca da expressão deste tipo de células em glândulas salivares de indivíduos já diabéticos, mas essa hipótese não é de descartar, dado que a maior parte da bibliografia refere alterações na função salivar induzidas por esta patologia, e as células mioepiteliais têm um papel importante na expulsão do fluido dos ácinos das glândulas (Garrett, 1987).

Quanto à imunomarcação para a  $\alpha$ -amilase, foi possível verificar-se a expressão desta enzima em diversas estruturas. Os ácinos da glândula parótida foram as estruturas mais intensamente marcadas, o que era de esperar, uma vez que esta glândula é constituída por ácinos serosos, responsáveis pela produção da maior parte do conteúdo em  $\alpha$ -amilase da saliva total. As meias-luas serosas nas glândulas sublinguais também apresentaram marcação, em contraste com os ácinos mucosos, embora não tão acentuada como nos ácinos da parótida.

Quando comparados os grupos, verificou-se que os ductos intralobulares da glândula parótida e os ductos granulares e estriados da glândula submandibular apresentavam uma marcação mais intensa nos animais do grupo GIR em relação ao controlo. Com base num estudo realizado por Hand *et al.* (1987), este aumento pode ser explicado pela ocorrência de endocitose da amilase secretada por parte das células dos ductos em ratos diabéticos. Segundo este estudo, e devido à condição patológica, proteínas “defeituosas” ou modificadas são sequestradas em vesículas e lisossomas pelas células dos ductos, de modo a removê-las do lúmen, antes que atinjam a cavidade oral. Daí ser detectada uma quantidade superior de proteínas salivares, como é o caso da  $\alpha$ -amilase nas células dos ductos, mesmo não apresentando capacidade de secreção.

Olhando em conjunto para os resultados obtidos pela análise à saliva, para a proteína -amilase, e as observações da expressão desta proteína nas glândulas salivares, podemos sugerir que o modelo de pré-diabetes usado no presente estudo, apesar de não apresentar alterações na expressão salivar de amilase, apresenta já alterações a nível das glândulas salivares. Desta forma, a função salivar parece estar já comprometida numa fase prévia ao estabelecimento da diabetes. Assim, é possível que existam já algumas diferenças na composição proteica da saliva, ainda que não aquelas que foram objecto deste estudo.



## 5. Conclusão

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica que se tem desenvolvido por todo o mundo a um ritmo muito acelerado, o que acarreta elevados custos humanos, sociais e económicos. Assim, o estudo desta patologia e dos seus estágios mais precoces revela-se de suma importância na prevenção e no atraso do seu desenvolvimento.

Neste estudo, realizado com base na comparação entre dois grupos de animais, um grupo controlo constituído por ratos Wistar normoglicémicos, e um grupo GIR, constituído por ratos pré-diabéticos, não foram encontradas diferenças na concentração proteica salivar total, nem na expressão de amilase na saliva total, o que sugere que algumas das alterações referidas na bibliografia como presentes em indivíduos diabéticos possam não estar ainda presentes numa fase prévia ao estabelecimento da patologia.

As glândulas salivares, sendo as principais produtoras das proteínas salivares existentes na saliva, foram também alvo de estudo neste trabalho.

A medição das áreas e perímetros dos ácinos das três glândulas maiores revelaram valores significativamente mais elevados para os animais do grupo GIR. Por outro lado, nos animais pré-diabéticos também foi encontrada uma grande acumulação de gotículas de lípidos no interior dos ácinos, possível reflexo do uso de lípidos como fonte de energia alternativa e/ou da endocitose de ácidos gordos circulantes, o que também contribui para o aumento do volume dos ácinos. Ambas as situações haviam sido já referidas por outros autores para indivíduos diabéticos, o que sugere a existência de algumas alterações ainda antes do desenvolvimento de hiperglicemia crónica.

No que diz respeito à presença de células mioepiteliais, observa-se que a presença destas células é superior nas glândulas sublinguais, seguindo-se as glândulas submandibulares e, por fim, as parótidas, não havendo, no entanto, diferenças entre os dois grupos experimentais. Isto significa que as possíveis alterações existentes na secreção salivar, já numa fase de pré-diabetes, não parecem estar relacionadas com uma diferente acção de expulsão de saliva por parte destas células.

Apesar de não se observarem alterações na expressão de  $\alpha$ -amilase na saliva, ao analisar as glândulas salivares verificaram-se diferenças entre os animais normoglicémicos e pré-diabéticos. Nestes últimos, parece haver uma maior expressão

desta proteína no citoplasma das células dos ductos das glândulas parótidas e nos ductos granulares das glândulas submandibulares.

Tendo em conta o total dos resultados obtidos, podemos afirmar que há alterações a nível da função salivar em indivíduos pré-diabéticos. A realização de estudos futuros que permitam compreender os motivos destas alterações e de que forma elas contribuem para as variações na composição salivar referidas aquando do estabelecimento da patologia, são necessários. Estas diversas questões, acerca das alterações salivares que ocorrem nas fases prévias ao aparecimento da DM, deverão ser alvo de maior atenção, de modo a que se possa estabelecer um perfil para pessoas com predisposição ao estabelecimento da doença e, assim, ser possível a aplicação precoce de diagnóstico e tratamento.

## Referências

- Alberti S, Spadella CT, Francischone TR, Assis GF, Cestari TM, Taveira LA. (2003) Exfoliative cytology of the oral mucosa in type II diabetic patients: morphology and cytomorphometry. *J Oral PatholMed* Oct;32(9):538-43
- American Diabetes Association (2004) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, Vol 27, S5-S10.
- Anderson LC (1998) Salivary gland structure and function in experimental diabetes mellitus. *Biomedical Reviews* Vol.9 107-119
- Anderson LC, Bevan CA (1992) Effects of streptozotocin diabetes on amylase release and cAMP accumulation in rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* Vol.37 331-336
- Anderson LC, Garrett JR (1986) Lipid accumulation in the mayor salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. *Arch Oral Biol* Vol. 31 469-475
- Arati S. Panchbhai, Shirish S. Degwekar and Rahul R. Bhowte (2010) Estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary total protein and salivary flow rate in diabetics in India . *J Oral Sci* 52, 359-368.
- Aydin S (2007) A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol* Vol.40 29-35
- Ben-Aryeh H, Serouya R, Kanter Y, Szargel R, Laufer D (1993) Oral health and salivary composition in diabetic patients. *J Diabetes Complications* 7, 57-62.
- Cabras T, et al (2010) Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type I diabetes. *MCP papers*
- Caseiro AJC (2007) *Proteómica das glândulas salivares de ratinho*. Universidade de Aveiro – Departamento de Química
- Dods MW et al. (2000) Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol* Vol 28 373-381
- Eckert R, Randall D, Augustine G (1988) *Animal Physiology – Mechanisms and adaptations*. Freeman 3<sup>rd</sup> Ed. New York 529-548

Edgar WM (1992) Saliva: its secretion, composition and function. Br Dent J No. 172 305-312

Edgar Wm, O'Mullane DM (1996) Saliva and Oral Health. British Dental Journal 2<sup>nd</sup> Ed No.105 281-286

Ellis GL, Aucliar PL, Gnepp DR (1991) Surgical Pathology of the Salivary Glands. Philadelphia: W. B. Saunders Company

Fedirko NV et al. (2006) Changes in functioning of rat submandibular salivary gland under streptozotocin-induced diabetes are associated with alterations of Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> transporting pumps. Biochim Biophys Acta Vol 1762 294-303

Garrett JR (1987) The proper role of nerves in salivary secretion: a review. J Dent Res Vol.66 387-397

Gonçalves C, Bairos V (2007) Histologia Texto e Imagens. Imprensa da Universidade 2<sup>a</sup> Ed. Coimbra 203-228

Hamman RF. (1992) Genetic and environmental determinants of non-insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab Rev No.8 287-338

Hand A R et al. (1987). Endocytosis of proteins by salivary gland duct cells. J Dent Res Vol 66 412-419

Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Ofidal V, Egea JC, Ossignol M, Sommerer N, Periere DD (2005) Characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. Proteomics Vol.5 4597-4607

Humphrey S, Williamson R. (2001) A review of saliva: normal composition, flow and function. The Journal of Prosthetic Dentistry Feb; Vol. 95 Num. 2: 162-69

Jaakko Tuomilehto, M. D. et al (2001) Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. N Engl J Med vol. 344 no. 18 1343-1350

Karabushi S, Matsuoka T, Hosoi K (2009) Hormone-induced granular convoluted tubule-like cells in mouse parotid gland. The Journal of Medical Investigation Vol: 56 148-153

Khovidhunkit SP et al. (2009) Xerostomia, hyposalivation and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. J Med Assoc Thai Vol. 92 1220-1228

Kim SK, Cuzzort LM (1990) Effects of diabetes and insulin on alpha-amylase mRNA levels in rat parotid glands. *J Dent Res.* Vol 69 1500-1504

Leite MF (2006) Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas. *Fac Odon Univ S.Paulo* 19-31

López M, Colloca M. (2003) Salivary characteristics of diabetic children. *Braz. Dent. J.* Vol. 14, 26-31.

Lopez ME, Colloca ME, Páez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A (2003) Salivary characteristics of diabetic children. *Braz Dent J* 14, 26-31.

Mahay S et al (2004). Streptozotocin induced type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid contents in the isolated rat parotid salivary gland. *Molecular and Cellular Biochemistry* Vol 17 1-8

Malaisse WJ (1982) Alloxan toxicity to pancreatic  $\beta$ -cell. *Biochem Pharmacol* Vol 31 3527-3534

Mealey B (2003) Diabetes mellitus. In: *Burket's oral medicine. Diagnosis and treatment*, 10th ed, Greenberg MS, Gilck M eds, BC Decker, Hamilton, 563-577.

Mealey B, Ocampo G. (2007) Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol.* Vol 44, 127-153

Moore P, Guggenheimer J. (2001) Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* Vol 92, 281-291.

Moriel, P et al. (2010) Influência do fumo na actividade da amilase salivar e na curva glicémica. *Rev. Nutr.* Vol 23, n.4 565-572

Nater UM (2009) Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology* Vol: 34 486-496

Negrato CA, Tarzia O (2010) Buccal alterations in Diabetes mellitus. *DMS* Vol 2 1-11

Newrick PG et al. (1991) Parotid salivary secretion in diabetic autonomic neuropathy. *J Diabet Complications* Vol.5 35-37

Nicklin MJH and Barrett AJ (1984) Inhibition of cysteine proteinases and dipeptidyl peptidase I by egg-white cistatin. *Biochem. J.* No. 233 245-253

Nilson R, Donath K (1981) Actin containing cells in normal human salivary glands. *Virchows Arch* Vol. 391 315-322

Noorafshan A (2006) Volume-weighted mean volume of submandibular gland acini in male and female diabetic rats. *Micron* Vol 37 613-616

Paiva C. (2001) Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus. *Medicina Interna* Vol.7 No.4 234-238

Perdersen AM, Bardow A, Jensen SB. (2002) Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* Vol 8, 117-129.

Raj PA, Jonhsson M, Levine JM, Nancollas CH (1992) Salivary statherin. *Journal of Biological Chemistry* Vol 267 No.9 5968-76

Rakeiten N, Rakeiten ML et al. (1993) Studies on the diabetic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Rep* Vol 29 91-98

Ranee Chatterjee, K.M. Venkat Narayan, Joseph Lipscomb and Lawrence S. Phillips Screening Adults for Pre-Diabetes and Diabetes May Be Cost-Saving. *Diabetes Care* July 2010 vol. 33 no. 7 1484-1490

Safioti LML (2005) Comparação dos níveis de histatinas da saliva da parótida entre sujeitos com doença periodontal e sujeitos sem história prévia de doença periodontal. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP

Scarano E (2010) Proteomics of saliva: a personal experience. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* No.30 125-130

Schneider H, Shaw J, Zimmet P. (2003) Guidelines for the detection of diabetes mellitus - diagnostic criteria and rationale for screening. *Clin Biochem Rev* Aug;24(3):77-80

Scully C et al (2008) Sialosis: 35 cases of persistent parotid swelling from two countries. *BJOMS* Vol 46 468-472

Seymor GJ et al. (2010) Collection, storage and processing of saliva samples for downstream molecular applications. *Methods in molecular biology*, Chapter 2

Stearns SB, Benzo CA (1983) A longitudinal and comparative study of some structural and hormonal alterations in the endocrine pancreas of spontaneously diabetic and streptozotocin-induced diabetic mice. *Acta Anat* Vol: 115 193-203

Tannenbaum GS, Colle E et al. (1981) Dynamic time course studies of spontaneous diabetic BB Wistar rat – longitudinal profiles of plasma growth hormone, insulin and glucose. *Endocrinology* Vol:109 1872-1879

Tatón J, Czech A, Piatkiewicz P. (2010) Insulin as the main regulator of cellular glucose utilization – aetiological aspects of insulin resistance. *Polish J Endocrinology* Vol.61 No.4 388-394

Tattersall, R (2009) *Diabetes, The Biography*. Oxford university Press.

Tisch R. and McDevitt H. (1996) Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Cell* Vol. 85 291-297

Vacca Smith AM, Bowen VH (2000) In situ studies of pellicle formation of hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* Vol 45 277-291

Vernillo AT. (2001) Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* Mar;91(3):263-70

Wang PL, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. (1994) Effect of chronic insulin administration on mouse parotid and submandibular gland function. *Proc Soc Exp Biol Med* Vol 87, 117-124.

Watanabe M et al. (2001) Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* Vol 87 117-124

Weiss R, Dufour S, Taksali SE (2003) Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet* Vol 362 951-957

Yavuzylmaz E, Yumak O, Akdoganli T, Yamalik N, Ozer N, Ersoy F, Yeniay I (1996) The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. *Aust Dent J* 41, 193-197.



# **ANEXOS**



# Anexo I



**Tabela 5:** Concentração proteica total obtida através dos métodos de Lowry e Coomassie, para as mesmas amostras de saliva.

	Concentração Proteica Total ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Lowry	3606,25	6600,00	6600,00	2657,81
Coomassie	1143,80	1921,15	2182,69	771,581

**Tabela 6:** Concentrações proteicas totais dos animais dos grupos Controlo (C1, C2, C3, C4, C5 e C6) e GIR (G1, G2, G3, G4, G5 e G6)

Animal	Concentração Proteica Total ( $\mu\text{g/mL}$ )	Animal	Concentração Proteica Total ( $\mu\text{g/mL}$ )
C1	834,67	G1	1465,46
C2	1008,00	G2	2521,85
C3	1352,44	G3	6968,53
C4	468,88	G4	1878,44
C5	3153,09	G5	772,20
C6	1055,99	G6	1442,88

SUMÁRIO						
	Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância	
	Controlo	18	14642,76	813,4864	423180,7	
	GIR	37	46360,6	1252,989	1931427	
ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	2339025	1	2339025	1,615739	<b>0,209238</b>	4,023017
Dentro de grupos	76725454	53	1447650			
Total	79064479	54				

**Figura17:** Análise estatística das concentrações proteicas totais a todas as amostras de saliva recolhidas aos grupos Controlo e GIR



# Anexo II



gel1		ratio banda amilase	por volume bandas	por volume	lane	Grupo	GIR	controlo	T-test
lane 2		0,51		0,43	GIR				
lane 3		0,45		0,42	controlo		0,43	0,42	0,244027
lane 4		0,50		0,38	GIR		0,38	0,39	
lane 5		0,44		0,39	controlo		0,37	0,43	
lane 6		0,47		0,37	GIR		0,36		
lane 7		0,55		0,43	controlo				
lane 8		0,44		0,36	GIR				
gel2		ratio banda amilase	por volume bandas	por volume	lane	Grupo	GIR	controlo	T-test
lane 1		0,11		0,10	controlo				
lane 2		0,06		0,05	GIR		0,05	0,10	0,5061
lane 3		0,04		0,04	GIR		0,04	0,13	
lane 4		0,14		0,13	controlo		0,07	0,09	
lane 5		0,07		0,07	GIR		0,25	0,25	
lane 6		0,09		0,09	controlo				
lane 7		0,25		0,25	GIR				
lane 8		0,27		0,25	controlo				
gel3		ratio banda amilase	por volume bandas	por volume	lane	Grupo	contando as duas bandas juntas		
lane 1		0,30		0,29	controlo		0,50353		
lane 2		0,44		0,43	GIR		0,439198		
lane 3		0,27		0,25	controlo		0,271693		
lane 4		0,14		0,12	GIR		0,139908		
lane 6		0,11		0,11	controlo		0,375885		
lane 7		0,04		0,04	GIR		0,330058		
gel4		ratio banda amilase	por volume bandas	por volume	lane	Grupo	GIR	controlo	T-test
lane 1		0,33		0,29	GIR				
lane 3		0,47		0,26	controlo		0,29	0,26	0,895599
lane 4		0,35		0,29	GIR		0,29	0,32	
lane 5		0,37		0,32	controlo		0,22	0,24	
lane 6		0,31		0,22	GIR		0,28	0,27	
lane 7		0,33		0,24	controlo		0,26		
lane 8		0,32		0,28	GIR				
lane 9		0,33		0,27	controlo				
lane 10		0,33		0,26	GIR				
gel5		ratio banda amilase	por volume bandas	por volume	lane	Grupo	GIR	controlo	T-test
lane 2		0,12		0,11	controlo				
lane 3		0,24		0,23	GIR		0,23	0,11	0,530313
lane 5		0,83		0,82	controlo		0,18	0,82	
lane 6		0,18		0,18	GIR		0,19	0,18	
lane 8		0,18		0,18	controlo				
lane 9		0,22		0,19	GIR				

**Tabela 7:** Comparação das percentagens de volume das bandas de -amilase entre os grupos controlo e GIR, para os vários géis SDS PAGE analisados



# Anexo III



### Kruskal-Wallis Test

Ranks			
	grupo	N	Mean Rank
perimetro	1	3684	3144,47
	2	3431	4002,02
	Total	7115	
area	1	3684	3056,41
	2	3431	4096,57
	Total	7115	

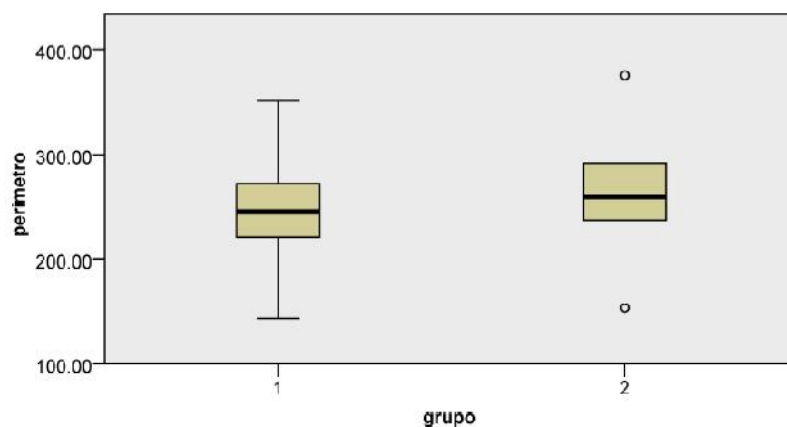
### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	perimetro	area
Chi-square	309,642	455,547
df	1	1
Asymp. Sig.	,000	,000

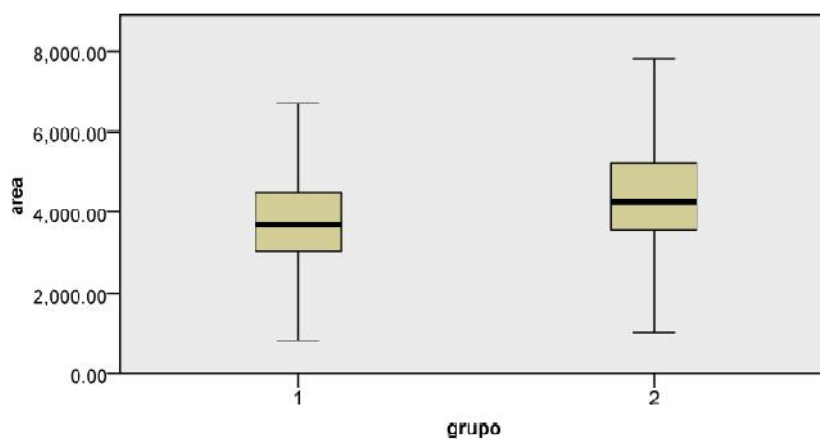
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupo

### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



**Figura 18:** Output da análise estatística referente ao perímetro e área da glândula parótida em Controlo (1) e GIR (2).

## Kruskal-Wallis Test

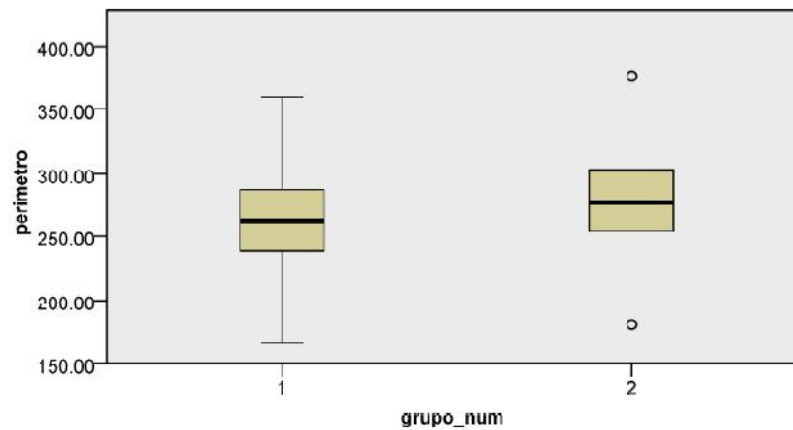
Ranks			
	grupo_num	N	Mean Rank
perimetro	1,00	3375	2675,53
	2,00	2610	3403,52
	Total	5985	
area	1,00	3375	2631,85
	2,00	2610	3460,00
	Total	5985	

Test Statistics <sup>a,b</sup>		
	perimetro	area
Chi-square	261,267	338,105
df	1	1
Asymp. Sig.	,000	,000

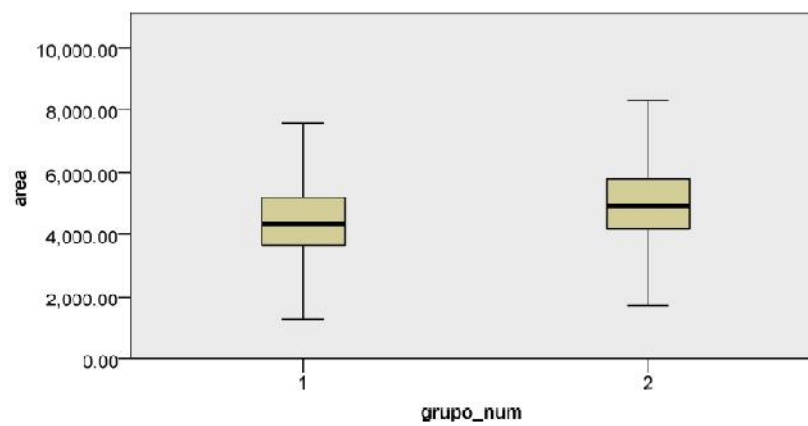
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:  
grupo\_num

## Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



## Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



**Figura 19:** Output da análise estatística referente ao perímetro e área da glândula submandibular em Controlo (1) e GIR (2).

## Kruskal-Wallis Test

### Ranks

	grupo	N	Mean Rank
perimetro	1	1355	1506,42
	2	1967	1768,33
	Total	3322	
area	1	1355	1515,84
	2	1967	1761,84
	Total	3322	

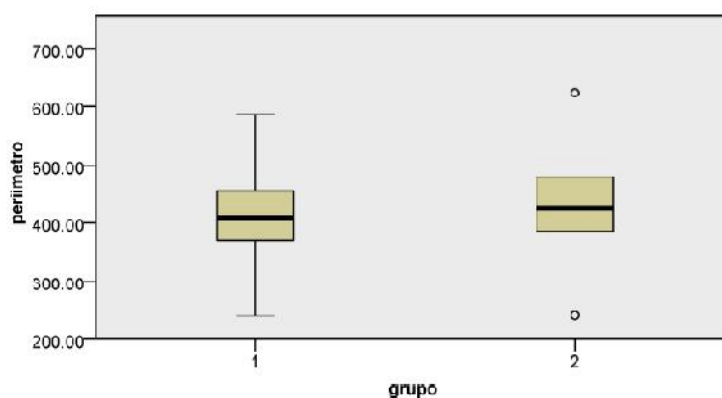
### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	perimetro	area
Chi-square	59,826	52,780
df	1	1
Asymp. Sig.	,000	,000

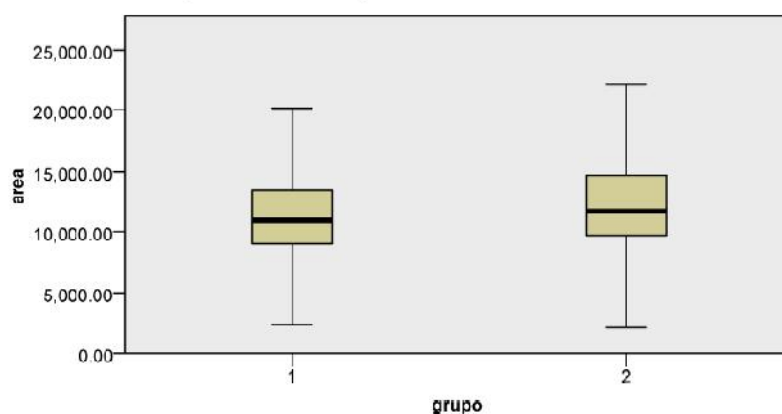
a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: grupo

### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



### Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



**Figura 20.** Output da análise estatística referente ao perímetro e área da glândula sublingual em Controlo (1) e GIR (2).

