ANA CAROLINA ROMERO

**Estudo do efeito da nefropatia crônica experimental induzida pelos 5/6 de
nephrectomia nas glândulas salivares de ratos**

São Paulo

2016

ANA CAROLINA ROMERO

**Estudo do efeito da nefropatia crônica experimental induzida pelos 5/6 de
nephrectomia nas glândulas salivares de ratos**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo programa de Pós Graduação em Biomateriais e Biologia Oral, para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biomateriais e biologia oral.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Rui de Albuquerque Carvalho

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Romero, Ana Carolina.

Estudo do efeito da nefropatia crônica experimental induzida pelos 5/6 de nefrectomia nas glândulas salivares de ratos / Ana Carolina Romero ; orientador Fernando Neves Nogueira; coorientador Rui de Albuquerque Carvalho. -- São Paulo, 2016.

125 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais e Biologia Oral). -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Glândulas salivares. 2. Nefrectomia. 3. Morfologia animal. 4. Metabolismo animal. 5. Estresse oxidativo. I. Nogueira, Fernando Neves. II. Carvalho, Rui de Albuquerque. III. Título.

Romero AC. Estudo do efeito da nefropatia crônica experimental induzida pelos 5/6 de nefrectomia nas glândulas salivares de ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico este trabalho a Deus, como forma de agradecimento;

Ao meu pai Vagner, inspiração para realização deste trabalho;

Em memória da minha linda avó Jaci.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus! Por ser o autor da minha vida, por ter guiado meus caminhos e me capacitado em cada novo desafio para chegar até aqui. Meu coração está profundamente grato por tudo que vivi e aprendi nesses anos de trabalho.

Agradeço de maneira muito especial a minha família. Aos meus pais Vagner Antônio Romero e Ester da Silva Romero, que sempre me apoiaram, incentivaram, educaram e me ensinaram valores profundos que me tornaram quem eu sou. Minha irmã Paula Cristiane Romero pela amizade, companheirismo e incentivos constantes. Agradeço também a todos os meus familiares, meus avós, grandes exemplos de vida, tios, tias, primos, primas por todo apoio e carinho. Tenho a certeza que sem vocês não teria chegado até aqui e saibam que são essenciais para eu seguir em frente. Amo vocês! Muito obrigada!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira por acreditar, sempre mais do que eu mesma acreditei, na minha capacidade. Pela confiança, liberdade de trabalho e por todas as oportunidades. Obrigada pela disposição sempre bem humorada de explicar e ensinar. Cresci durante todos esses anos de trabalho e devo parte do meu amadurecimento a você. Muito obrigada!

Agradeço também ao meu coorientador e supervisor do período sanduíche, Prof. Dr. Rui de Albuquerque Carvalho. Professor, muito obrigada por me acolher em sua casa e em seu laboratório. Agradeço pela paciência ao me ensinar e pela confiança. Foi uma honra trabalhar ao lado do senhor, aprendi não somente um pouco sobre metabolismo e RMN, mas também muito sobre seriedade e integridade no trabalho. Muito obrigada!

Agradeço aos professores que diretamente colaboraram com este trabalho, Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez pelo suporte com a parte histológica, por sempre me receber de maneira solícita e pela utilização de toda estrutura do Laboratório de Biologia Oral. Profa. Dra. Lina Carvalho responsável pelo serviço de anatomia patológica da Universidade de Coimbra

por ter aceitado colaborar com este trabalho, pelo seu olhar de patologista e pelas belas imagens que trouxe de Portugal.

Agradeço também aos professores do laboratório de bioquímica oral, Prof. Dr. José Nicolau pelos ensinamentos e carinho com que sempre me tratou, foi uma honra aprender e conviver com o senhor. A Profa. Dra. Aline Simões pela agradável convivência e também pelos ensinamentos.

Sempre vou agradecer a Profa. Dra. Cássia Bergamaschi por ter me ensinado a cirurgia dos 5/6 de nefrectomia e por todo conhecimento transmitido. Admiro muito a senhora! Muito obrigada!

Agradeço ao meu grande amigo e técnico do laboratório, Douglas Nesadal. Muito obrigada por ter me ensinado e ajudado no trato com os animais, com os experimentos, mas, sobretudo pelo seu apoio. Você é uma das pessoas mais incríveis que eu conheço e tive a honra de conviver. Agradeço pelos conselhos, por sempre se importar e pela amizade que transpõe os muros da universidade.

A querida amiga e técnica do LBO, Elisangela Chinen. Elis, obrigada por ter sido minha “cúmplice” nos muitos pilotos de fixação, nas inúmeras tentativas de padronizações das colorações, pela paciência e por sempre estar disposta a me ensinar e ajudar. Agradeço pelos conselhos e pela amizade, muito obrigada!

Agradeço minha amiga Dra. Flávia Ibuki, pela convivência em grande parte da pós-graduação, pela parceria e boas risadas. Foram infusões, vitaminas, muitos ratos e muito trabalho; obrigada pelo seu apoio!

Aos presentes que Coimbra colocou em minha vida, pessoas fabulosas que conheci.

Agradeço à querida Dona Amélia, minha mãezinha portuguesa, pelo carinho que me recebeu e sempre me tratou, pelas conversas, boas risadas e bolinhos com café. Muito obrigada!

À querida Dra. Ivana Jarak pela amizade, ensinamentos transmitidos e pelos momentos agradáveis que vivemos juntas. Sempre serei grata a você e ao Prof. Rui por terem me recebido e tratado tão bem! Muito obrigada! Agradeço também ao Dr. Ludgero Tavares por sempre estar disposto a me ensinar e ajudar, além das boas risadas e trocas culturais Brasil x Portugal.

Agradeço aos amigos brasileiros que conheci por lá: Aniele Cunha e Naycon Rodrigues; as queridas piauienses Alessandra Ribeiro e Pauline Santos e também aos queridos Aline Dionísio e César Valle. Deus colocou vocês no meu caminho na hora certa, guardo comigo ótimas memórias da convivência, boas risadas e aventuras.

Agradeço também ao técnico da plataforma RMN da Universidade de Coimbra Pedro Cruz por todo suporte e simpatia.

Agradeço aos queridos amigos de laboratório: Juliana Castro, Simone Peixe, Dra. Luana Campos, Dra. Cíntia Yuki, Cláudia Cotomacio, Alexandre Jun, Gabriella Schröter, Filipi Pereira, Gabriela Magliano, Regiane Rodrigues, Bruna Perestrelo, Taís Carvalho e Dra. Polliane Carvalho pela agradável convivência diária, por toda ajuda e carinho com que sempre me trataram.

A todos os amigos de departamento, com os quais que convivi durante esses anos, em especial aos queridos: Dra. Marcela Rodrigues, Ezequias Rodrigues, Erick Lima, Dr. Alexander Nishida, Bruno Lopes, Pavel Reyes, Mariana Reis, Mariel Maas, Livia Natale, Pedro Albuquerque e Ranulfo Miranda. Obrigada a todos.

Aos meus grandes amigos: Aline Lara, Daniella Gaino, Danielle Carvalho, Débora Perroni, Fábio Tartari e Thiago Ramalho. Lá se vão dez anos de amizade! Agradeço pelo apoio que sempre encontro em vocês e pelo forte laço que construímos.

A todos os professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da FOU SP, em especial àqueles com que tive maior convivência durante o estágio de docência na graduação.

Agradeço às secretárias Rosa Cristina Nogueira e Elidamar Guimarães pela paciência e muitas orientações durante todo o curso, muito obrigada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelas bolsas de estudos no Brasil e de doutorado sanduíche concedidas.

Por último, mas não menos importante, meu agradecimento a todos os ratos empregados neste estudo, sem eles, eu nada teria feito.

*There's nothing you can do that can't be done.
Nothing you can sing that can't be sung.
Nothing you can say, but you can learn
how to play the game
it's easy.*

*Nothing you can make that can't be made.
No one you can save that can't be saved.
Nothing you can do, but you can learn
how to be you in time
it's easy.*

*All you need is love, all you need is love,
All you need is love, love. Love is all you need.*

John Lennon e Paul McCartney

RESUMO

Romero AC. Estudo do efeito da nefropatia crônica experimental induzida pelos 5/6 de nefrectomia nas glândulas salivares de ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

A doença renal crônica (DRC) gera manifestações orais e alterações salivares nos pacientes, entretanto poucos estudos avaliaram os efeitos desta doença nas glândulas salivares. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da nefropatia crônica experimental na morfologia, metabolismo, estresse oxidativo e concentrações iônicas nas glândulas parótida (PA) e submandibulares (SM) de ratos. A nefropatia crônica experimental foi induzida pelos 5/6 de nefrectomia (grupo DRC) e os resultados foram comparados com os grupos Sham e Controle no tempo experimental de 12 semanas. Foram avaliados os pesos corpóreos iniciais e finais, níveis séricos e urinários de ureia e creatinina, a depuração de creatinina e excreção proteica urinária. A morfologia do córtex renal foi avaliada pela contagem de glomérulos em 30 campos x200 de aumento por grupo, além disso, foram avaliadas a presença de glomeruloesclerose e fibrose intersticial no grupo DRC. Nas glândulas PA e SM, foi realizada contagem de ductos em 30 campos x400 de aumento por grupo e avaliação de fibrose e de glicogênio no parênquima glandular. A análise metabólica avaliou os efeitos da DRC e estímulos simpáticos e parassimpáticos da salivação nos fluxos metabólicos glicolítico, oxidativo e anaplerótico utilizando infusões com [U-¹³C]Glicose ou [1,6-¹³C₂]Glicose, [2-¹³C]Glicose e [U-¹³C]Ácidos graxos, e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de próton (¹H) e carbono 13 (¹³C) em alta resolução de extratos glandulares como técnica de detecção de incorporação de ¹³C em metabólitos intermediários. Atividades enzimáticas avaliadas foram: hexoquinase [HK], fosfofrutoquinase-1(PFK-1), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), amilase, peroxidase e catalase. Além disso, foram quantificados os conteúdos de malondialdeído [MDA], glicogênio e concentrações iônicas de cálcio, fósforo e sódio. Foram observadas diminuições significativas dos pesos corpóreos finais,

aumentos significativos das concentrações séricas e diminuições das concentrações urinárias de ureia e creatinina, diminuição da depuração de creatinina e aumento da excreção proteica no grupo DRC comparado aos grupos Controle e Sham. Na avaliação do córtex renal encontramos diminuição significativa da contagem glomerular, infiltrado inflamatório, atrofia tubular, glomeruloesclerose e fibrose intersticial. Na avaliação histológica glandular foi observado aumento significativo da contagem de ductos e diminuição de glicogênio na glândula SM. Na análise metabólica observamos a prevalência do fluxo glicolítico nas glândulas salivares. O estímulo salivar promoveu aumentos significativos na razão ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina nos grupos Controle e Sham, com exceção do grupo DRC PA, onde em repouso se observou um aumento, comparando com os grupos Sham e Controle. No grupo DRC PA foram observadas diminuições significativas dos níveis de ^{12}C -Alanina, ^{12}C -Creatina e ^{12}C -Glicose sem estímulo e aumento de ^{12}C -Acetato com estímulo. No DRC SM detectaram-se aumento dos níveis de ^{12}C -acetato e diminuição significativa da relação ^{13}C 3-Lactato/ ^{13}C 3-Acetato pós-estímulo indicativos de inibição do metabolismo oxidativo. Estas alterações nos níveis de metabólitos e suas razões, bem como nos níveis de enriquecimento ^{13}C , denotam alterações profundas a nível metabólico nas glândulas salivares devido a DRC. Nas análises enzimáticas foram encontradas na glândula PA diminuições significativas das atividades da PFK-1 e LDH em relação ao grupo Controle e aumentos significativos da peroxidase e catalase comparado aos grupos Controle e Sham. Na glândula SM foi observada diminuição significativa na atividade enzimática da PFK-1 comparado ao grupo Controle. Além disso, foram observados aumentos significativos do conteúdo de MDA nas glândulas PA e SM e aumento significativo da concentração de sódio na glândula SM comparado aos grupos Controle e Sham. As modificações estruturais, metabólicas, oxidativas e iônica evidenciam a disfunção glandular na DRC e podem estar associadas às alterações salivares que caracterizam a doença.

Palavras chave: Glândulas salivares. 5/6 de nefrectomia. Morfologia. Metabolismo. Isotopômeros de ^{13}C . Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Romero AC. Effects of the experimental chronic nephropathy induced by 5/6 nephrectomy in rats' salivary glands [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Original.

Chronic kidney disease (CKD) promotes oral manifestations and salivary changes in patients, but few studies have evaluated the effects of this disease in the salivary glands. The aim of this study was to evaluate the effects of experimental chronic nephropathy in morphology, metabolism, oxidative stress and ionic concentrations in parotid (PA) and submandibular glands (SM) of rats. Experimental chronic nephropathy was induced by 5/6 nephrectomy (CKD group) and the results were compared with the Sham and Control groups at 12 weeks experimental period. The initial and final body weights, serum and urinary levels of urea and creatinine, creatinine clearance and protein excretion were evaluated. The morphology of the renal cortex was assessed by counting glomeruli in 30 fields x200 magnification per group, moreover, the presence of glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in CKD group were also evaluated. The PA and SM histological evaluation was made by ducts count in 30 fields x400 magnification per group and assessment of fibrosis and glycogen in the glandular parenchyma. Metabolic analysis measured the effects of CKD and sympathetic and parasympathetic stimulation of salivation in glycolytic, oxidative and anaplerotic metabolic fluxes using infusions with [U- ^{13}C]Glucose or [1,6- $^{13}\text{C}_2$]Glucose, [2- ^{13}C]Glucose and [U- ^{13}C]Fatty acids, using high resolution proton (^1H) and carbon 13 (^{13}C) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of glandular extracts as detection technique of ^{13}C incorporation in intermediary metabolites. Enzyme activities were measured: hexokinase [HK], 1-phosphofructokinase (PFK-1), pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), amylase, peroxidase and catalase. Furthermore, the malondialdehyde [MDA], glycogen content and calcium, phosphorus and sodium ionic concentrations were quantified. Significant decreases of final body weights, significant increases in serum concentrations and decreases in urinary concentrations of urea and creatinine,

decreased creatinine clearance and increased protein excretion were observed in CKD group comparing with the Control and Sham groups. In the evaluation of the renal cortex, a significant decrease in glomerulus count, inflammatory infiltration, tubular atrophy, glomerulosclerosis and interstitial fibrosis were found. In glandular histological evaluation was observed a significant increase in the ducts count and reduced glycogen content in SM gland. Metabolic analysis revealed the prevalence of glycolytic flux in the salivary glands. The salivary stimulus promoted significant increases of ^{12}C -Lactate/ ^{12}C -Alanine ratio in the Control and Sham groups, except the DRC PA group, which at rest had an increase of the ratio compared to the sham and control groups. In DRC PA group significant decreases in the levels of ^{12}C -Alanine, ^{12}C -Creatine and ^{12}C -Glucose without stimulation and increase of ^{12}C -Acetate with stimulus were observed. In CKD SM were detected increased levels of ^{12}C -acetate and significant decrease of the ^{13}C -Lactate/ ^{13}C -Acetate indicative of post-stimulus inhibition of oxidative metabolism. These changes in levels of metabolites and their ratios, as well as the enrichment levels ^{13}C denote major changes at the metabolic level in salivary glands due to DRC. In the enzymatic analyzes, at DRC PA gland were found significant decreases of PFK-1 and LDH activities compared to the Control group and significant increases of peroxidase and catalase compared to control and Sham groups. In DRC SM gland was observed a significant decrease in the enzymatic activity of PFK-1 compared to Control group. In addition, significant increases in MDA content in PA and SM and significant increase in sodium concentration were observed in the SM compared to the control and Sham groups. Structural, metabolic, oxidative stress and ionic changes demonstrate the occurrence of glandular dysfunction in CKD, which might be associated with the salivary changes that characterize the disease.

Keywords: Salivary glands. 5/6 nephrectomy. Morphology. Metabolism. ^{13}C isotopomers. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Sequência cirúrgica dos 5/6 de nefrectomia. Os animais são anestesiados, tricotomizados, feita laparotomia, nefrectomia total direita, ligadura dos ramos posterior e ântero superior da artéria renal esquerda. Podemos observar imediata isquemia tecidual, prévio à sutura do animal.....49
- Figura 4.2 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da hexoquinase57
- Figura 4.3 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da fosfofrutoquinase-158
- Figura 4.4 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da piruvato quinase59
- Figura 4.5 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da lactato desidrogenase.60
- Figura 4.6 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase.....60
- Figura 4.7 - Esquema da utilização de [U-¹³C]Glicose como marcador metabólico de carbono para monitorar funções da glicólise e ciclo de Krebs. As moléculas são representadas por seus esqueletos carbônicos, círculos vazios representam ¹²C e círculos pretos a ¹³C. [U-¹³C]Glicose originará duas moléculas de [U-¹³C]Piruvato (F1), o qual pode seguir à fermentação láctica com a atuação da enzima lactato desidrogenase (LDH), para formar [U-¹³C]Lactato (F2) ou seguem à incorporação de átomos ¹³C em intermediários do ciclo de Krebs (F3) e a sua cinética pode ser seguida através das marcações ¹³C nos multipletos do carbono 4 do glutamato. [1,2-¹³C₂]Acetil-CoA marca os carbonos 4 e 5 do α-

cetoglutarato, consequentemente origina [4,5- $^{13}\text{C}_2$]Glutamato (D45) e a combinação de [1,2- $^{13}\text{C}_2$] Acetil- CoA com uma molécula de oxaloacetato previamente marcado gera outros multipletos ao nível de C4 glutamato. O ciclo do piruvato (F6) é responsável por outras marcações aos níveis do fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato e, consequentemente, lactato. F4 representa o fluxo anaplerótico através da piruvato carboxilase e F5 indica o equilíbrio rápido entre o α -cetoácido piruvato e alanina catalisada pela alanina aminotransferase. Em cada satélite de $^{13}\text{CH}_3$ -Lactato surge [U- ^{13}C]Lactato, linhas 1,3,4,5,6 e 8, que são distinguíveis devido às $^2J_{\text{HC}}$, $^3J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HH}}$, dupletos de tripletos, já que $^2J_{\text{HC}}$ e $^3J_{\text{HC}}$ tem magnitudes semelhantes, e [2,3- $^{13}\text{C}_2$]Lactato, linhas 2 e 7 são distinguíveis por $^2J_{\text{HC}}$. Na ressonância do carbono 2 do lactato podemos distinguir o quarteto Q, dupletos D₂₃ e D₁₂, além do singuleto S. Na ressonância do carbono 4 do glutamato temos o singuleto, essencialmente devido a abundância natural de ^{13}C e o duplete 4,5 distinguíveis devido a uma $J_{\text{C4-C5}}$63

Figura 4.8 - Esquema metabólico da utilização de [1,6- $^{13}\text{C}_2$]Glicose, [2- ^{13}C]Glicose e [U- ^{13}C]Ácidos graxos, como marcadores metabólicos de carbono para monitorar as funções da glicólise, via das pentose fosfato e ciclo de Krebs. As moléculas são representadas por seus esqueletos carbônicos, círculos vazios representam ^{12}C e círculos pretos a ^{13}C . A [1,6- $^{13}\text{C}_2$]Glicose originará duas moléculas de [3- ^{13}C]Piruvato na glicólise (F1), o qual pode seguir para a fermentação láctica pela ação da enzima lactato desidrogenase (F3), originando duas moléculas de [3- ^{13}C]Lactato ou seguir para incorporação de ^{13}C nos intermediários do ciclo de Krebs (F4) e a sua cinética pode ser seguida através das marcações ^{13}C nos multipletos do carbono 4 do glutamato. Com origem glicolítica, teremos a [2- ^{13}C]Acetil-CoA que marca o carbono 4 do α -cetoglutarato, consequentemente origina [4- ^{13}C]Glutamato (C4S) e a combinação de [2- ^{13}C]Acetil-CoA com uma molécula de oxaloacetato previamente marcado gera outros multipletos ao nível C4 glutamato, como o [3,4- $^{13}\text{C}_2$] em uma segunda volta no ciclo. À partir da β -oxidação com a metabolização do [U- ^{13}C]Ácidos graxos, teremos a formação de [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Acetil-CoA. Se esta molécula for incorporada aos intermediários do ciclo de Krebs marcará os carbonos 4 e 5 do α -cetoglutarato, consequentemente formará [4,5- $^{13}\text{C}_2$]Glutamato em uma primeira volta no ciclo e [3,4,5- $^{13}\text{C}_3$]Glutamato em voltas subsequentes. A utilização da [2- ^{13}C]Glicose, se metabolizada pela via das pentose fosfato (F2), originará isotopômeros que podem ser observados ao nível de Lactato ([3- ^{13}C]Lactato e [1,3- $^{13}\text{C}_2$]Lactato).....67

Figura 5.1 - A, B e C - Fotomicrografias representativas do córtex renal dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. Grupo DRC demonstrou diminuição significativa da contagem de glomérulos comparando com os

grupos Controle e Sham ($p>0.05$). D - Avaliação glomerular foi representada pela média $\pm$ erro padrão. $*p<0,05$, ($n=3$). Ampliação original x200, Barra=100 μm , G=Glomérulos. 75

Figura 5.2 - A, B e C - Fotomicrografias do córtex renal coradas com hematoxilina e eosina (HE) representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. No grupo DRC (C) nota-se expansão intersticial e glomerular, as setas indicam os infiltrados inflamatórios. D, E e F - Fotomicrografias do córtex renal coradas com tricômico de Mallory (TM) representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. No grupo DRC (F), as cabeças de seta indicam as áreas de fibrose intersticial. G, H e I - Fotomicrografias do córtex renal coradas com ácido periódico de Schiff (Chatrchyan; Khachatryan) representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. No grupo DRC (I) nota-se expansão glomerular, atrofia tubular e espessamento da membrana basal das alças capilares glomerulares. Ampliação original x200, Barra=100 μm , G= Glomérulo. 76

Figura 5.3 - A, B e C - Fotomicrografias representativas da glândula parótida coradas com HE dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. D, E e F - Fotomicrografias representativas da glândula submandibular coradas com HE dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. Grupo DRC (F) demonstrou aumento significativo da contagem de ductos (setas) comparando com os grupos Controle e Sham. D e G - Avaliação dos ductos das glândulas parótida e submandibulares respectivamente, foi representada pela média $\pm$ erro padrão, ($n=3$). $**p<0,01$. Barra= 50 μm 77

Figura 5.4 - A, B e C - Fotomicrografias representativas do parênquima da glândula parótida coradas com hematoxilina e eosina (HE) dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. As setas são indicativas dos septos interlobulares. D, E e F - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC coradas com tricômico de Mallory (TM), respectivamente. As setas são indicativas dos septos interlobulares. G, H e I - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, corados com ácido periódico de Schiff, respectivamente. Ampliação original X200 e x400, Barra = 100 μm e 50 μm . DS = ducto estriado, DE = ducto excretor. 78

Figura 5.5 - A, B e C - Fotomicrografias representativas do parênquima da glândula submandibular coradas com hematoxilina e eosina (HE) dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. D, E e F - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente, coradas com tricômico de Mallory (TM),. G, H e I - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente, corados com ácido periódico de Schiff (Chatrchyan; Khachatryan). Nota-se no grupo DRC (I) menor intensidade de coloração nos ácinos. Ampliação original X200 e x1000, Barra = 100 µm. DG=ducto granuloso, DE= ducto excretor.....79

Figura 5.6 - A - Atividade enzimática da Amilase da glândula parótida; B- Atividade enzimática da Amilase da glândula submandibular; C- Atividades enzimáticas da Peroxidase das glândulas parótidas e submandibulares; D - Atividades enzimáticas da Catalase das glândulas parótidas e submandibulares; E - Concentrações de proteínas totais das glândulas parótidas e submandibulares. Análises realizadas nos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como Média ± erro padrão, n = 10. * p<0,05, **p<0,01.....80

Figura 5.7 - Atividade enzimática da hexoquinase (HK; B - Atividade enzimática da fosfofrutoquinase-1 (PFK-1); C - Atividade enzimática da piruvato quinase (PK) das; D - Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH); E - Atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD); F - Concentrações de proteínas totais das glândulas parótidas e submandibulares. Análises realizadas nas glândulas parótida e submandibular dos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como Média ± erro padrão, n = 10. * p<0,05.....81

Figura 5.8 - Concentrações de ^{12}C -Lactato (A), ^{12}C -Alanina (B), $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ (C), ^{12}C -Acetato (D) e ^{12}C -Creatina (E), das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como Média ± erro padrão, n = 6. * p<0,05, ** p<0,01.....83

Figura 5.9 - Expansões representativas das regiões metílicas dos espectros ^1H RMN dos extratos das glândulas parótidas dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso (KatchiburianArana-Chavez) e estimulados (D-F) e das glândulas submandibulares em repouso (G-I) e estimulados (J-L). Lac = Lactato, Ala = Alanina, Ace = Acetato, Suc = Succinato e Cre = Creatina.84

Figura 5.10 - Razões de ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina (A), ^{13}C -Lactato/ ^{13}C -Alanina (B), % $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Lactato (C), $^{13}\text{C}_3$ -Lactato/ $^{13}\text{C}_4$ -Glutamato (D) e $^{13}\text{C}_3$ -/ $^{13}\text{C}_4$ -Glutamato das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, n = 6. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001.86

Figura 5.11 - Expansões de espectros ^{13}C RMN representativos das regiões C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato em repouso (A), C2-Lactato em repouso (B), C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato com estímulo (C) e C2-Lactato com estímulo (D). Na região C2-Lactato podemos distinguir as diferentes populações de isotopômeros: $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ Lactato- Quarteto (Q), $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Lactato- Dubleto 2,3 (D_{23}), $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Lactato- Dubleto 1,2 (D_{12}) e $[2-^{13}\text{C}]$ Lactato- Singleto (S).87

Figura 5.12 - Concentrações de glicose da glândula submandibular dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e estimulados. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, n=3. * p<0,05.....88

Figura 5.13 - Concentrações de ^{12}C -Lactato (A), ^{13}C -Lactato (B), ^{12}C -Alanina (C), ^{12}C -Acetato (D), ^{13}C -Acetato (E), ^{12}C -Succinato (F), ^{12}C -Creatina (G) e ^{12}C -Glicose (H), das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, n=6. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.90

Figura 5.14 - Expansões representativas das regiões metílicas dos espectros ^1H RMN dos extratos das glândulas parótidas dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso (KatchiburianArana-Chavez) e estimulados (D-F) e das glândulas submandibulares em repouso (G-I) e estimulados (J-L). Lac=Lactato, Ala=Alanina, Ace=Acetato, Suc= Succinato, Cre= Creatina e Glu=Glicose.....91

Figura 5.15 - Razões de ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina (A), $^{13}\text{C}_3$ -Lactato/ $^{13}\text{C}_3$ -Alanina (B), $^{13}\text{C}_3$ -Lactato/ $^{13}\text{C}_3$ -Acetato (C) e $^{13}\text{C}_3$ -/ $^{13}\text{C}_4$ -Glutamato das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como (D). Média $\pm$ erro padrão, n=6. * p<0,05, ** p<0,01 e *** p<0,001.93

Figura 5.16 - Expansões de espectros ^{13}C RMN representativos das regiões C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato em repouso (A), C2-Lactato em repouso (B), C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato com estímulo (C) e C2- Lactato com estímulo (D).....93

Figura 5. 17 - Concentrações de malondialdeído da glândula parótida (A) e glândula submandibular (B) nos grupos Controle, Sham e DRC. Média $\pm$ erro padrão, $8 < n < 10$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$94

Figura 5.18 - Concentrações de glicogênio da glândula parótida (A) e glândula submandibular (B) nos grupos Controle, Sham e DRC. Média $\pm$ erro padrão, $n = 10$. ** $p < 0,01$95

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Médias e desvios padrões dos pesos inicial e final, análises séricas e da utilização da gaiola metabólica dos grupos Controle, Sham e DRC. n = número de animais por grupo; ** significa $p < 0,01$ comparando com grupos Controle e Sham; *** significa $p < 0,001$ comparando com grupos Controle e Sham; # significa $p < 0,001$ comparando com o grupo Controle. 74
- Tabela 5.2 - Concentrações iônicas da glândula parótida dos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. n= número de animais por grupo..... 95
- Tabela 5.3 - Concentrações iônicas da glândula submandibular dos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. n= número de animais por grupo. # $= p < 0,05$ comparando com o grupo Controle; ** $p < 0,01$ comparando com os grupos Controle e Sham..... 96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	graus Celsius
g	gramas
kDa	quilo Dalton
mg/dL	miligrama por decilitro
mL/min	mililitros por minuto
mmol/L	milimol por litro
mg de tecido	miligramas de tecido
nm	nanômetros
PPM	parte por milhão
µg	micrograma
µL/min	microlitros por minuto
µM/mL	micromol por mililitros
ΔA/min	variação da absorbância por minuto
DRC	doença renal crônica
hs	horas
PA	glândula parótida
SM	glândula submandibular
HK	hexoquinase
ATP	adenosina trifosfato
AMP _c	adenosina monofosfato cíclico
DAG	diacilglicerol
PIP ₂	fosfatidilinositol bifosfato
IP ₃	inositol trifosfato
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PFK-1	fosfofrutoquinase-1
PK	piruvato quinase
LDH	lactato desidrogenase

G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
TPI	triose fosfato isomerase
GADPH	gliceraldeído fosfato desidrogenase
IDH	isocitrato desidrogenase
ALDO	aldolase
TIM	triose isomerase
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PEP	fosfoenolpiruvato
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
FADH ₂	flavina-adenina dinucleótido reduzido
FAD	flavina-adenina dinucleótido oxidado
MDA	malondialdeído
EROS	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase
CAT	Catalase
GP _x	glutathione peroxidase
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HE	hematoxilina e eosina
TM	tricômico de Mallory
PAS	ácido periódico de Schiff
RMN	ressonância magnética nuclear
¹ H	próton
¹² C	carbono 12
¹³ C	carbono 13
[U- ¹³ C]Glicose	glicose uniformemente marcada em ¹³ C
[2- ¹³ C]Glicose	glicose marcada em ¹³ C na posição 2
[1,6- ¹³ C ₂]Glicose	glicose marcada em ¹³ C nas posições 1 e 6
[U- ¹³ C]Ácidos graxos	ácidos graxos uniformemente marcados em ¹³ C
[2- ¹³ C]Acetil- CoA	isotopômero de acetilcoenzima A marcada em ¹³ C na posição 2

[1,2- ¹³ C]Acetil CoA	isotopômero de acetilcoenzima A marcada em ¹³ C nas posições 1 e 2
[4- ¹³ C]Glutamato	isotopômero de glutamato marcado em ¹³ C na posição 4
[4,5- ¹³ C ₂]Glutamato	isotopômero de glutamato marcado em ¹³ C nas posições 4 e 5
[3,4,5- ¹³ C ₃]Glutamato	isotopômero de glutamato marcado em ¹³ C nas posições 3,4 e 5
[3- ¹³ C]Lactato	isotopômero de lactato marcado em ¹³ C na posição 3
[1,3- ¹³ C ₂]Lactato	isotopômero de lactato marcado em ¹³ C nas posições 1 e 3
[2,3- ¹³ C ₂]Lactato	isotopômero de lactato marcado em ¹³ C nas posições 2 e 3
¹³ C3-Lactato	enriquecimento do carbono 3 do lactato
¹³ C3-Alanina	enriquecimento do carbono 3 da alanina
¹³ C3-Acetato	enriquecimento do carbono 3 do acetato
¹³ C4-Glutamato	enriquecimento do carbono 4 do glutamato
¹³ C3-Glutamato	enriquecimento do carbono 3 do glutamato
PCA	ácido perclórico
D ₂ O	água deuterada
UI	unidades internacionais
KHz	quilo-hertz

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	GLÂNDULAS SALIVARES E SALIVA	27
2.2	DOENÇA RENAL CRÔNICA E SALIVA	34
2.3	ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA RENAL CRÔNICA	37
2.4	METABOLISMO	39
2.4.1	Glicólise	39
2.4.2	Ciclo de Krebs	40
2.4.3	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear e análise de isotopômeros de ¹³ C	41
2.4.4	Metabolismo e doença renal crônica	43
2.5	METABOLISMO DAS GLÂNDULAS SALIVARES	45
3	PROPOSIÇÃO	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1	ANIMAIS	48
4.2	INDUÇÃO DA NEFROPATIA	48
4.3	COLETA E ANÁLISES EM GAIOLA METABÓLICA	50
4.3.1	Análises das amostras de urina	50
4.3.1.1	Concentração urinária de ureia e excreção de ureia em 24 horas	50
4.3.1.2	Concentração urinária de creatinina	51
4.3.1.3	Concentração de proteínas totais	51
4.4	COLETA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SANGUE	51
4.4.1	Concentração sérica de ureia	52
4.4.2	Concentração sérica e depuração de creatinina em 24 horas	52
4.5	COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA	52
4.5.1	Contagens de ductos glandulares e glomérulos	53
4.5.2	Coloração de Tricômico de Mallory para avaliação de fibrose tecidual	53
4.5.3	Coloração de ácido periódico de Schiff	54
4.6	COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES ENZIMÁTICAS	54

4.6.1 Análise das atividades enzimáticas da amilase, peroxidase e catalase.....	55
4.6.1.1 Atividade da enzima Amilase	55
4.6.1.2 Atividade da enzima Peroxidase	55
4.6.1.3 Atividade da enzima Catalase	56
4.6.2 Análises enzimáticas- Metabolismo da glicose	56
4.6.2.1 Atividade da enzima Hexoquinase	57
4.6.2.2 Atividade da enzima Piruvato quinase.....	58
4.6.2.3 Atividade da enzima Lactato desidrogenase	59
4.6.2.4 Atividade da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase.....	60
4.6.2.5 Concentração de proteínas totais.....	61
4.7 AMOSTRAS PARA ANÁLISE METABÓLICA POR RESSONÂNCIA	
MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	61
4.7.1 Infusão de [U-¹³C]Glicose.....	61
4.7.2 Infusão de [1,6-¹³C₂]Glicose, [2-¹³C]Glicose e [U-¹³C]Ácidos graxo	64
4.7.3 Estimulação das vias simpáticas e parassimpáticas	65
4.7.4 Coleta das amostras.....	65
4.8 ANÁLISES ¹H E ¹³C DE EXTRATOS GLANDULARES POR	
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	67
4.8.1 Extração de metabólitos das glândulas salivares	67
4.8.2 Extração de glicogênio para análise por ¹H RMN	68
4.8.3 Análises de Próton (¹H) e Carbono 13 (¹³C) por RNM.....	69
4.9 QUANTIFICAÇÃO DO MALONDIALDEÍDO	70
4.10 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO GLANDULAR	70
4.11 ANÁLISES IÔNICAS.....	71
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	72
5 RESULTADOS	73
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS	73
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	74
5.2.1 Rins	74
5.2.2 Glândulas salivares	76
5.3 ANÁLISES ENZIMÁTICAS	79
5.3.1 Amilase, Peroxidase e Catalase	79
5.3.2 Enzimas- Metabolismo da glicose	81

5.4	ANÁLISE METABÓLICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	82
5.4.1	Resultados com infusão de [U-¹³C]Glicose	82
5.4.1.1	<i>Análise do glicogênio na glândula submandibular por RMN</i>	87
5.4.2	Resultados com infusão de [1,6-¹³C₂]Glicose, [2-¹³C]Glicose e [U-¹³C]Ácidos graxos	88
5.5	CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO	94
5.6	CONCENTRAÇÕES DE GLICOGÊNIO GLANDULAR.....	94
5.7	CONCENTRAÇÕES IÔNICAS	95
6	DISCUSSÃO	97
7	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	109
	Anexo A	124

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um problema de saúde pública mundial. Apesar da dificuldade em estimar a prevalência e incidência total mundial, em parte pela qualidade desigual dos registros nos diferentes países, a organização mundial da saúde estima que 10% da população mundial possua algum grau de severidade desta doença, gerando altos gastos governamentais no seu tratamento (Schieppati; Remuzzi, 2005; White et al., 2008).

DRC é definida pela diminuição da taxa de filtração glomerular ou aumento da excreção urinária de albumina por um período superior a três meses. Seus estágios iniciais são geralmente assintomáticos e os fatores de risco para o início e progressão da doença incluem o envelhecimento, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2; no seu último estágio existe a necessidade de terapias de hemodiálise e transplante renal (Jha et al., 2013).

Diversos estudos encontraram manifestações orais, salivares e nas glândulas salivares destes pacientes.

As principais alterações orais observadas em pacientes com falência renal crônica são: odor de uréia, xerostomia, alteração de paladar e dor na língua e ou mucosa (Kao et al., 2000; Kho et al., 1999). Gengivites e periodontites são achados comuns em pacientes sob-hemodiálise (Klassen; Krasko, 2002) sendo observada também grande prevalência de cálculo dental nestes pacientes (Naugle et al., 1998). Uma redução na atividade da função das glândulas salivares, determinada por cintilografia, foi observada quando comparados pacientes sob-hemodiálise com pacientes controles com função renal normal (Kao et al., 2001).

Em relação à secreção salivar, estudos descrevem alterações de fluxo estimulado e não estimulado com a diminuição do mesmo em pacientes com alterações renais quando comparado com pacientes controles (Kao et al., 2000; Kho et al., 1999; Martins et al., 2006). Alterações na composição salivar também foram encontradas nestes pacientes com o aumento do pH e da capacidade tampão na saliva não estimulada (Kho et al., 1999); aumento na secreção de proteínas (Martins et al., 2006; Vesterinen et al., 2007); alteração de atividade da enzima peroxidase (Martin et al, 2006; Savica et al., 2008) e

alterações na secreção de eletrólitos com o aumento da secreção de fosfato, potássio, zinco, magnésio (Martins et al., 2006) e uréia (Cardoso et al., 2009).

Estudos que avaliaram as glândulas salivares nesta condição são escassos na literatura. Um deles observou a presença de atrofia e fibrose em análises histológicas de glândulas salivares labiais de pacientes submetidos à hemodiálise comparando com pacientes controles (Postorino et al., 2003). Outro estudo encontrou dano em DNA também em glândulas salivares acessórias de pacientes submetidos à hemodiálise (Ersson et al., 2011).

O modelo animal experimental de indução da nefropatia crônica, os 5/6 de nefrectomia, consiste na ligadura de dois ramos da artéria renal esquerda e nefrectomia total direita, e resulta na diminuição da função renal e aparecimento dos sinais de uremia com o tempo (Chanutin; Ferris, 1932; Zhang; Kompa, 2014). Este modelo tem sido amplamente utilizado em estudos dos efeitos sistêmicos, como por exemplo, alterações metabólicas e de estresse oxidativo, além da progressão e terapias na DRC (Liu et al., 2015; Peralta-Ramirez et al., 2014).

Um estudo recente utilizou este modelo experimental na avaliação de alterações salivares, encontrando alterações significativas de fluxo e composição salivar, compatíveis com os achados clínicos, mostrando a viabilidade da sua utilização em estudos dos possíveis efeitos da DRC nas glândulas salivares (Romero et al., 2016).

Neste estudo iremos utilizar a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), associada com a administração de substratos enriquecidos com isótopos estáveis (por exemplo, ^{13}C), para efetuar estudos do metabolismo de glândulas salivares no modelo experimental 5/6 de nefrectomia. Esta metodologia metabólica tem sido explorada em vários sistemas vivos, como culturas celulares (Abrantes et al., 2014), órgãos perfundidos (Carvalho et al., 2010) e também estudos *in vivo* (de Graaf et al., 2011; Wang et al., 2016). A administração *in vivo* destas sondas metabólicas permitem extrair uma riqueza de informações sobre o metabolismo do tecido de interesse, dificilmente obtida por qualquer outra metodologia.

Dessa forma, a importância da execução deste estudo se deve pela escassez de estudos que avaliam os efeitos da DRC, doença tão prevalente na população mundial, nas glândulas salivares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GLÂNDULAS SALIVARES E SALIVA

As glândulas salivares constituem um grupo de glândulas exócrinas localizadas na região da boca, são responsáveis pela secreção de seus produtos para a cavidade oral, formando no conjunto a saliva. São classificadas em: glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) e glândulas salivares menores ou acessórias localizadas na submucosa oral, com exceção da gengiva e palato duro anterior. As glândulas salivares são constituídas por um parênquima com origem no ectoderma, formado por unidades funcionais denominados adenômeros e um sistema de ductos. São envoltos pelo estroma glandular, composto de tecido conjuntivo do tipo frouxo, que possui os suprimentos sanguíneo, linfático e nervoso glandular. As glândulas parótidas têm a estrutura similar a uma árvore, com condutos compridos e grandes áreas de tecido mesenquimal entre os crescentes ramos epiteliais. Em contraste, as glândulas submandibulares e sublinguais são mais compactadas, possuem aspecto de “cachos de uvas” (Katchiburian; Arana-Chavez, 2012).

O modelo que explica os estágios de desenvolvimento das glândulas salivares utiliza a glândula submandibular de camundongos. Primeiramente, ocorre na metade da décima primeira semana de desenvolvimento um aumento da espessura do epitélio ao lado da língua, fase conhecida como pré-broto. Estas regiões espessas se projetam ao mesênquima subjacente e na maneira que o epitélio invagina, forma um botão ligado à superfície por um conduto epitelial. Este conduto vai continuar a formar o ducto principal da glândula salivar e é visível como uma pequena ondulação na superfície por via oral.

A proliferação celular é elevada no epitélio e relativamente baixa no mesênquima em todas as fases de desenvolvimento da glândula. Por volta da décima terceira semana, inicia-se a morfogênese nos poucos botões já formados e os mesmos continuam a se desenvolver no dito estágio

pseudoglandular. Ramificações e morfogênese ocorrem com a continuação da proliferação celular, ocorrem alongamento e formação dos lumens, de modo que na décima quarta semana a glândula é altamente ramificada. A diferenciação funcional com a aparência de células pró-acinares e produtos de secreção se iniciam *in vivo* após a décima quinta semana e continua pós-nascimento.

Estudos que utilizam culturas *ex vivo* de glândulas submandibulares, destacaram o importante papel indutor da cápsula de tecido conjuntivo na ramificação epitelial e morfogênese. Análises confocais dos múltiplos tipos celulares em cultura sugerem uma complexa interação entre células endoteliais, neuronais e a ramificação e morfogênese do epitélio (Hoffman et al., 2002; Knosp et al., 2012; Patel et al., 2006; Tucker, 2007).

As unidades secretoras terminais são compostas por células organizadas de forma justaposta formando o lúmen na continuidade das porções apicais e podem ser de três tipos: mucosas, serosas ou seromucosas, dependendo da composição da sua secreção; distinguem-se na organização tecidual e estrutura celular em análises histológicas. Células serosas são piramidais, exibem um núcleo central redondo e pequenos grânulos na porção apical corados pela hematoxilina e o citoplasma corado pela eosina. As células mucosas são colunares, em repouso possuem grandes grânulos de secreção localizados nas porções médias e apicais, sendo estes fracamente corados com hematoxilina e eosina e o núcleo fica localizado na porção basal.

Os produtos de secreção destas células são liberados no conjunto de ductos, primeiramente no intercalar, posteriormente estriado e excretor, o qual se abre na cavidade oral. Os ductos intercalares são revestidos por células cúbicas, enquanto os ductos estriados são compostos por células cilíndricas com organização simples ou pseudoestratificada. Presentes na base dessas células são observados as estrias, que indicam a localização de mitocôndrias; e por fim, os ductos excretores são revestidos por um epitélio estratificado. Muitas espécies de roedores, incluindo camundongos e ratos possuem um tipo a mais de ducto entre os ductos intercalares e estriados, o ducto granuloso. Os grânulos presentes nestes ductos são fortemente corados com hematoxilina e outros corantes básicos como azul de toluidina e contêm fatores de crescimento e proteases não específicas. Nos humanos, que não possuem

estes grânulos, estas proteínas são produzidas e secretadas pelos ductos estriados. Associados às unidades terminais e as porções iniciais dos ductos (intercalares e granulosos no caso de roedores) ocorrem às células mioepiteliais. As células mioepiteliais possuem a capacidade de contração semelhante ao músculo liso, localizadas entre a lâmina basal e a membrana citoplasmática com interação via desmossomos. A forma destas células depende da sua localização: ao nível das células secretoras têm aspecto dendrítico, cercando as mesmas; já ao nível dos ductos, possuem aspecto fusiforme com poucos prolongamentos citoplasmáticos. A contração das células mioepiteliais auxilia a liberação dos grânulos de secreção das unidades terminais, reduz o volume luminal resultando no aumento do fluxo salivar e também auxilia no suporte e estabilidade do tecido glandular em momentos de grande produção salivar (Miletich, 2010).

A inervação da glândula parótida ocorre através do nervo glossofaríngeo (IX nervo craniano) , o qual transporta fibras pré-ganglionares parassimpáticas a partir do núcleo salivatório inferior, na medula do tronco cerebral para sinapse no gânglio óptico. O gânglio óptico fica localizado à distância da glândula parótida, adjunto ao forame oval na base do crânio, próximo à divisão mandibular do nervo trigêmeo (V nervo craniano). Fibras pós-ganglionares partem do gânglio óptico para fornecer inervação salivar parassimpática para a glândula parótida via ramo aurículo temporal do nervo trigêmeo.

A inervação das glândulas submandibulares e sublinguais ocorre através de fibras parassimpáticas transportadas pelo nervo facial. As fibras pré-ganglionares deixam o núcleo salivar superior e passam pelo canal auditivo interno para se unirem ao nervo facial. As fibras são transportadas pelo nervo corda do tímpano no processo mastoide e entram na fossa infratemporal. Na fossa infratemporal fibras pré-ganglionares se unem ao nervo lingual (ramo da divisão mandibular do nervo trigêmeo) , o qual posteriormente leva estas fibras para sinapse no gânglio submandibular. Fibras pós-sinápticas curtas deixam o gânglio para inervar as glândulas submandibulares e sublinguais, as quais irão estimular a secreção de salivas seromucosas e mucosas respectivamente.

Os centros primários simpáticos de inervação ficam localizados em segmentos torácicos superiores da medula espinhal. O tronco simpático paravertebral transporta as fibras ascendentes pré-ganglionares até o gânglio

torácico. Fibras pós-ganglionares simpáticas deixam o gânglio para inervar as regiões torácica superior, cervical e craniofacial. As fibras correspondentes às glândulas salivares percorrem o plexo e ramos da artéria carótida externa, incluindo a artéria facial. Fibras pós-ganglionares do plexo da carótida externa emitem ramos para alcançar todos os três pares de glândulas salivares (Ferreira; Hoffman, 2013).

O processo secretório é bem conhecido e está relacionado ao estímulo dos sistemas nervoso simpático e parassimpático. Ambos promovem a secreção salivar, porém, com características diferentes. O estímulo simpático leva a produção/secreção de uma saliva viscosa, rica em proteínas, enquanto o estímulo parassimpático leva a produção/secreção de uma saliva aquosa, rica em água e eletrólitos (Tucke; Miletich, 2010).

O processo de transdução de sinal também é conhecido e diferente para os dois sistemas. Resumidamente, no estímulo simpático, quando o receptor β -adrenérgico é ativado, ocorre a ligação com uma proteína de membrana (proteína G), havendo a exposição de sua subunidade α , ativando a enzima adenilato ciclase, que gera cAMP a partir de ATP. O cAMP, livre no citosol, liga-se à Proteína Quinase A (PK-A). A PK-A é formada por 2 subunidades, a catalítica e a regulatória. O cAMP liga-se à subunidade reguladora liberando a porção catalítica. Esta por sua vez, fosforila proteínas alvo, promovendo a exocitose. Quando o estímulo é parassimpático, após a ligação ao receptor muscarínico, a proteína G também é clivada nas mesmas subunidades. A subunidade α da proteína G também pode se ligar a outra proteína de membrana chamada Fosfolipase C. Esta promoverá a quebra do fosfatidilinositolbisfosfato (PIP_2) em diacilglicerol e inositol trifosfato (IP_3). O IP_3 , agora livre no citosol, permite a abertura de canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático rugoso, promovendo o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Este íon liga-se a calmodulina (uma proteína ligadora de Ca^{2+}). O DAG, que permaneceu na membrana, ativa outra proteína de membrana, a proteína quinase C (PK-C), que, ligada ao complexo Ca^{2+} -calmodulina, promoverá a fosforilação de proteínas específicas do citosol e da membrana, promovendo também a exocitose (Proctor; Carpenter, 2007; Vatta et al., 2002). Desta maneira, são considerados como principais segundos mensageiros o cAMP, na via simpática, e o Ca^{2+} na via parassimpática (Nicolau, 1998).

A secreção de água e eletrólitos é dependente diretamente do aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} . Três mecanismos são conhecidos, sendo o principal decorrente da abertura de canais de Cl^- na membrana luminal. Basicamente, este fenômeno leva a um aumento de sua concentração na região luminal, criando um potencial elétron negativo. Íons Na^+ chegam a esta região através da passagem pelo espaço intercelular, criando um gradiente osmótico que culmina na passagem de água também pelo espaço intercelular (Melvin et al., 2005). Neste momento temos uma saliva isotônica em relação ao plasma no lúmen, conhecida como saliva primária. Conforme a saliva flui pelos ductos, ocorre uma reabsorção dos íons Na^+ e Cl^- e a secreção de íons K^+ e HCO_3^- pelas células estriadas, alterando a concentração destes na saliva que chega à cavidade oral, tornando-a hipotônica (em relação ao Na^+ e Cl^-). O transporte de água também ocorre graças a proteínas de membrana conhecidas como aquaporinas. A presença da aquaporina 5 (AQP-5) na membrana apical de células acinares e sua importância na secreção de água para a saliva já foi demonstrada (Delporte; Steinfeld, 2006; Edgar et al., 2004).

A saliva total é composta principalmente pela secreção das glândulas salivares e também pelo fluido gengival, microrganismos e restos alimentares. A saliva é rotineiramente classificada em não estimulada e estimulada. O estudo de Johnson e colaboradores analisaram o fluxo e composição proteica em repouso e com estímulos mecânico e gustatórios das salivas separadamente coletadas da glândula parótida e das glândulas submandibulares e sublinguais humanas. Os resultados mostraram que, em repouso, as glândulas submandibulares e sublinguais contribuem com maior fluxo. Em relação à secreção proteica, estas glândulas contribuem igualmente em relação à glândula parótida. O estímulo mecânico gera aumento de volume e diminuição da concentração de proteínas totais na saliva da glândula parótida. Com estímulos gustatórios com ácido cítrico observaram aumentos de fluxo proporcionais a intensidade do estímulo. Em relação à concentração proteica, este tipo de estímulo diminuiu a concentração na saliva da glândula parótida e não mostrou alteração significativa na saliva das glândulas submandibulares e sublinguais (Johnson et al., 2000).

Em indivíduos saudáveis, a produção diária de saliva varia entre 0,5 a 1,5 litros e é composta por 99% de água e 1 % de componentes orgânicos e

inorgânicos. Alguns componentes inorgânicos, eletrólitos, são: sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfato; os compostos orgânicos são uma grande variedade de proteínas como enzimas, imunoglobulinas e possui também produtos nitrogenados como uréia e amônia (Dodds et al., 2005).

As funções salivares estão diretamente correlacionadas à sua composição e é importante salientar que os componentes salivares são ditos multifuncionais (realizam mais de uma função e redundantes realizam semelhantes funções, mas em diferentes graus).

As funções salivares são classificadas em cinco grandes grupos:

1) Lubrificação e proteção dos tecidos orais. A saliva age como uma barreira contra agentes irritantes, incluindo enzimas proteolíticas e hidrolíticas produzidas no biofilme dental, potenciais agentes carcinogênicos oriundos de cigarros ou outras substâncias químicas exógenas. Os componentes relacionados com a lubrificação são as mucinas. As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular que constituem cerca de 26% das proteínas secretadas e possuem suas propriedades bioquímicas e funcionais devido aos seus resíduos terminais, que podem ser entre outros: ácido siálico, galactose ou fucose. Dois tipos de mucinas estão presentes na saliva humana: glicoproteína mucina oligomérica (MG1) com massa molecular superior a 1000 kDa produzida preferencialmente pela glândula submandibular que tem como característica a aderência aos dentes e também a formação de complexos com outras proteínas salivares como as estaterinas e histatinas auxiliando na depuração de bactérias. A outra é a glicoproteína mucina monomérica (MG2) com massa molecular de 200-250 kDa que é bastante eficaz na agregação bacteriana, levando à sua depuração. Apesar de contribuírem com apenas 10% do volume total de saliva produzido, as glândulas salivares acessórias produzem cerca de 70% das mucinas. A ocorrência dos sintomas clássicos de xerostomia como dor, ulceração e dificuldade na deglutição, pode estar relacionada com a diminuição da produção das mucinas salivares (Amerongen et al., 1995; Leach, 1963; Tabak et al., 1982; Zalewska et al., 2000).

2) Capacidade tampão. Os principais componentes relacionados a esta propriedade da saliva de resistência em alterar o pH com pequenas adições de ácido ou base, são os íons bicarbonato, fosfato, ureia e proteínas anfotéricas. O principal sistema tampão é o bicarbonato, atua principalmente em saliva

estimulada e é capaz de neutralizar os ácidos provenientes do metabolismo bacteriano do biofilme dental.

3) Manutenção da integridade dental. O líquido presente nos espaços intercristalinos do esmalte, em pH próximo à neutralidade é uma solução supersaturada que contém os íons Ca^{2+} e $(\text{PO}_4)^{3-}$. O pH crítico de desmineralização do cristal de hidroxiapatita do esmalte é 5,5, quando ocorre a penetração de ácidos no biofilme até à superfície dental e espaços intercristalinos, provocando a liberação de íons. Remineralização é o processo de reposição dos minerais perdidos na superfície dental. As altas concentrações salivares de cálcio e fosfato, mantidas por proteínas salivares, são responsáveis pelos processos de remineralização e maturação do esmalte.

4) Ação antimicrobiana. As glândulas salivares secretam agentes imunológicos e não imunológicos que atuam na proteção dental e da superfície das mucosas. Os principais componentes imunológicos são as imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, sendo o maior componente a IgA. Enquanto ativas na superfície da mucosa, são capazes de atuar na neutralização de vírus, como anticorpos para antígenos bacterianos, na agregação bacteriana e dessa forma diminuir a fixação bacteriana nos tecidos hospedeiros. Os componentes não imunológicos são mucinas, peptídeos, proteínas como lactoferrina (imunidade nutricional), lisozima (lise de parede celular bacteriana) e peroxidase (antioxidante e antimicrobiano) (Humphrey; Williamson, 2001; Pedersen et al., 2002).

5) Deglutição e digestão. Além do auxílio na formação do bolo alimentar para posterior deglutição, característica dependente do fluxo salivar e de proteínas como as mucinas, outra importante ação da saliva é a digestão. A ação digestiva na cavidade oral ocorre graças às ações da alfa-amilase salivar e da lipase lingual. A alfa-amilase é a enzima mais característica da saliva sendo secretada principalmente pela glândula parótida. É responsável pelo início da digestão dos polissacarídeos através da hidrólise da ligação glicosídica α 1-4. É secretada sob estímulo autonômico nervoso principalmente nas células acinares da glândula parótida e em menor proporção nas glândulas submandibulares. Ambas as isoformas glicosiladas e não glicosiladas já foram identificadas com pesos moleculares 54-57 kDa (Kauffman et al., 1970). Além da função digestiva, também é responsável por desempenhar um papel na

saúde dental, uma vez que se liga a estreptococos e está envolvida na modulação da adesão de bactérias em superfícies orais (Pedersen et al., 2002).

Qualquer alteração em uma das fases dos complexos processos de secreção salivar pode promover redução do fluxo que pode ou não estar relacionada à sensação de boca seca (xerostomia) ou modificações da composição salivar. Condições temporárias de disfunção salivar tais como depressão, infecções nas glândulas salivares ou também como efeito colateral de algumas medicações, especialmente antidepressivos, agentes ansiolíticos, anti-hipertensivos, diuréticos e anti-histamínicos são os mais comunmente relacionados à hipossalivação e a xerostomia. Radioterapia de cabeça e pescoço induz danos permanentes ao tecido glandular, promovendo sua hipofunção. Além disso, uma variedade de condições sistêmicas pode promover disfunções glandulares, dentre elas, condições autoimunes como a síndrome de Sjögren e fibrose cística, desordens neurológicas como a síndrome de Holme's Adie e paralisia de Bell, além de outras doenças como diabetes (Sreebny; Valdini, 1988) e a doença renal crônica (Llena-Puy, 2006; Naugle et al., 1998).

2.2 DOENÇA RENAL CRÔNICA E SALIVA

As doenças renais representam um grande problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde estima que 10% da população mundial possui algum grau de severidade da doença e milhões morrem anualmente por não ter acesso a tratamentos (Weiner, 2007).

Em torno de dois milhões de pessoas no mundo receberam tratamentos de hemodiálise ou transplante renal para permanecerem vivas em 2011, porém este número pode representar apenas 10% do total que necessita destes tratamentos para viver, já que 90% dos pacientes tratados na falência renal são de países desenvolvidos, que ainda podem pagar os custos das terapias necessárias (Couser et al., 2011; El Nahas, 2005).

A dificuldade na estipulação da total prevalência se deve principalmente pela qualidade desigual dos censos realizados nos diferentes países. No Brasil, o senso de diálise realizado em 2013 pela Sociedade Brasileira de Nefrologia estimou que o total de pacientes em tratamento dialítico seria de 100.397 pessoas (Sesso et al., 2014).

A DRC é dividida em estágios que indicam a progressão da sua severidade. Os estágios iniciais (estágios 1 e 2) são caracterizados pela presença do dano renal sem alteração de sua função e são geralmente assintomáticos, porém existe um risco significativo de progressão da doença. Com o agravamento da doença, a função renal começa a se deteriorar (estágios 3 e 4). Eventualmente ocorre a Insuficiência Renal (estágio 5), necessitando de terapias de hemodiálise ou transplante renal (K/DOQI, 2002).

A DRC, principalmente nos estágios mais avançados pode causar manifestações orais e salivares, observados em diversos estudos.

As principais alterações orais observadas em pacientes com falência renal crônica são: odor de ureia, xerostomia, alteração de paladar e dor na língua e ou mucosa (Kao et al., 2000; Kho et al., 1999). Gengivites e periodontites são achados comuns em pacientes submetidos à hemodiálise (Klassen; Krasko, 2002) e também grande prevalência de cálculo dental (Naugle et al., 1998). Outro estudo recente identificou perda precoce dentária nestes pacientes comparando com pacientes controles (Limeres et al., 2016).

Estudos que avaliaram a secreção salivar descrevem alterações de fluxo estimulado e não estimulado com a diminuição do mesmo em pacientes com alterações renais quando comparado com pacientes controles (Kao et al., 2000; Kho et al., 1999; Martins et al., 2006; Martins et al., 2008). Notoriamente ocorre o aumento significativo do fluxo salivar posteriormente ao transplante renal com diminuição da xerostomia e da sensação de sede (Bots et al., 2007). A diminuição do fluxo salivar observada em pacientes submetidos à hemodiálise é geralmente associada a possíveis alterações nas glândulas salivares, uso de medicações, restrição hídrica e possivelmente ao envelhecimento.

A cintilografia é uma técnica que pode avaliar de forma dinâmica, objetiva e quantitativa a função das glândulas salivares, distinguindo anormalidades na produção (pela taxa de captação) e secreção (pela taxa de

excreção). Em um estudo cintilográfico, pacientes com manifestações orais e submetidos à hemodiálise apresentaram diminuições significativas nas taxas de captação e excreção em ambos os pares de glândulas parótida e submandibular comparando com pacientes controle (Kao et al., 2000). Outro estudo similar corrobora estes achados e demonstrou que a produção de saliva e a excreção são significativamente menores na glândula parótida de pacientes submetidos à hemodiálise comparando com pacientes controles (Kaya et al., 2002).

Alterações na composição salivar também foram encontradas nestes pacientes, com o aumento do pH e da capacidade tampão em saliva não estimulada (Kho et al., 1999); aumento na secreção de proteínas (Martins et al., 2006; Vesterinen et al., 2007); alteração de atividade da enzima peroxidase (Martins et al., 2006; Savica et al., 2008) e alterações na secreção de eletrólitos com o aumento da secreção de fosfato, potássio, zinco, magnésio (Martins et al., 2006) e ureia (Cardoso et al., 2009). Um estudo recente identificou aumentos significativos da secreção de imunoglobulinas (IgA e IgG) em pacientes submetidos à hemodiálise e sugeriram a sua utilização como marcador salivar (Pallos et al., 2015). A possibilidade da utilização da saliva no diagnóstico e na mensuração da função renal foi sugerida em estudos que analisaram níveis salivares de ureia e creatinina correlacionando aos níveis séricos (Suzuki et al., 2016; Yajamanam et al., 2016).

Poucos estudos avaliaram as glândulas salivares destes pacientes. O único estudo histológico que avaliou glândulas salivares acessórias de 17 pacientes submetidos à hemodiálise revelou acentuada atrofia em 41% destes pacientes. O fluxo salivar foi inversamente correlacionado com o grau de atrofia e fibrose e com o conteúdo lipídico nas glândulas examinadas (Postorino et al., 2003). Outro estudo encontrou dano em DNA também em glândulas salivares acessórias de pacientes submetidos à hemodiálise (Ersson et al., 2011).

Em um estudo em nosso laboratório, observamos que na saliva de ratos com ablação de 5/6 da massa renal, coletada 12 semanas após a cirurgia, há uma redução no fluxo e aumento das atividades específicas das enzimas amilase e peroxidase, sendo esta última em quase 800%. Estes dados sugerem possíveis alterações no processo de secreção salivar e possivelmente no sistema antioxidante das glândulas salivares (Romero et al., 2016).

Fica evidente a escassez de relatos na literatura que avaliem o efeito da doença renal crônica nas glândulas salivares. A utilização do modelo animal de nefropatia crônica pode, dessa forma, auxiliar na explicação de alterações salivares observadas nos pacientes com esta doença.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E DOENÇA RENAL CRÔNICA

O oxigênio (O_2) é uma molécula estável que atua nos organismos como um aceptor de elétrons, que é reduzido em água durante a respiração celular nas mitocôndrias. Durante o processo de redução, o oxigênio pode receber somente um elétron, ao invés dos dois possíveis, gerando radicais de oxigênio, que podem causar danos celulares.

O termo radical livre refere-se a qualquer elemento químico que contenha um ou mais elétrons não pareados. Conceitualmente, podemos considerar o O_2 como um radical livre, porém pelo fato desta molécula apresentar dois elétrons com mesmo spin, a sua reatividade é diminuída, pois ela somente poderá interagir com moléculas que tenham elétrons com spins contrários ao seu, o que é mais difícil de ocorrer ao acaso na natureza (Betteridge, 2000).

A mesma molécula de oxigênio pode apresentar arranjos diferentes de elétrons, o que dará origem a outras moléculas. Se os dois últimos elétrons estiverem no mesmo orbital, ou os elétrons de orbitais diferentes apresentarem spins contrários, darão origem ao oxigênio singlete ($1\Delta gO_2$ e $1\Sigma g+O_2$). Se a molécula nativa receber um elétron a mais, completando uma orbital, dará origem ao ânion superóxido (O_2^-). Se o ânion superóxido receber mais um elétron, dará origem ao peróxido (O_2^{2-}) (Halliwell; Gutteridge, 2003).

Esses compostos são conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio. As EROs podem agir de várias maneiras no organismo, promovendo alterações de resíduos de proteínas, comprometendo sua função biológica e a peroxidação lipídica.

O organismo dispõe de mecanismos chamados de sistemas antioxidantes, que são capazes de prevenir os danos que estas espécies

reativas de oxigênio poderiam causar no organismo. Os mecanismos são divididos em sistema enzimático, composto pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); e pelo sistema não enzimático, que inclui compostos como a vitamina E, vitamina C, carotenóides entre outros (Gate et al., 1999).

O distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor da formação de danos é chamado de dano oxidativo ou estresse oxidativo (Halliwell; Gutteridge, 2003). Relatos na literatura falam a respeito do estresse oxidativo no estado de uremia, mostrando tanto o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio quanto a diminuição da atividade do sistema antioxidante, com a diminuição dos níveis séricos enzimáticos de pacientes com falência renal crônica, sendo o estresse oxidativo um potencial mediador das alterações cardiovasculares, neurológicas, inflamatórias dentre outras encontradas na falência renal crônica (Ceballos-Picot et al., 1996; Vaziri, 2004).

Estudos têm mostrado que produtos decorrentes do metabolismo do ácido úrico podem ser grande fonte de estresse oxidativo nesta doença. Além disso, a retenção destas toxinas acaba promovendo processos inflamatórios em diversos tecidos, com aumento da atividade de linfócitos (ativando IL-1 β e IL-8), que também levam a um estresse oxidativo. Associado a isso, a síntese do ácido úrico pode também promover um estresse oxidativo pela atividade da enzima xantina oxidoreductase que não possui capacidade de ligação com o NADH, e permite a formação de O₂⁻ (Small et al., 2012).

Dessa forma, seria de grande valia o estudo de parâmetros antioxidantes e o efeito desta condição em marcadores de dano nas glândulas salivares.

2.4 METABOLISMO

2.4.1 Glicólise

As funções exercidas pelos órgãos dependem basicamente do equilíbrio entre a produção e o consumo de energia. O desdobramento de carboidratos a moléculas menores constitui uma das mais importantes vias de obtenção de energia intracelular. A glicose é o monômero mais comum nos carboidratos que são utilizados pelas células do nosso organismo. Assim sendo, será dada particular ênfase ao catabolismo da glicose.

A glicólise ocorre no citosol, sendo frequentemente dividida em duas fases, preparatória e de pagamento. A fase preparatória promove a fosforilação da glicose e a conversão em duas trioses, gliceraldeído-3-fosfato, com o consumo de 2 moléculas de ATP. Na fase de pagamento, ocorre a oxidação das trioses a piruvato produzindo neste processo 4 moléculas de ATP e 2 de NADH/H⁺. O primeiro passo da glicólise é a fosforilação em C6 a glicose-6-fosfato com o consumo de ATP e atuação da enzima hexoquinase. Posteriormente ocorre a isomerização a frutose-6-fosfato seguida de uma nova fosforilação agora em C1, também a partir de ATP. Forma-se a frutose-1,6-bifosfato com a atuação da enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), sendo este passo reconhecido como um dos principais pontos de regulação da sequência glicolítica. A aldolase cliva a molécula de frutose entre C3 e C4 gerando gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxicetona-3 fosfato, que podem se interconverter pela ação da enzima triose-fosfato-isomerase (TPI).

O segundo estágio da glicólise inicia com a atuação da enzima gliceraldeído-fosfato-desidrogenase (GAPDH), oxidando gliceraldeído-3-fosfato a 1,3 bifosfoglicerato com a redução de NAD⁺ a NADH/H⁺. De seguida a fosfoglicerato quinase promove a transferência do grupo fosforil, gerando 1 ATP e 3-fosfoglicerato. Fosfoglicerato mutase produz 2-fosfoglicerato e a enzima enolase promove a desidratação a fosfoenolpiruvato. O último passo é a conversão do fosfoenolpiruvato a piruvato com a atuação da enzima piruvato quinase e formação de ATP. Em anaerobiose ocorre a redução do piruvato a

lactato, reação catalizada pela lactato desidrogenase (LDH), recebendo elétrons do NADH/H^+ (Marzzoco; Torres, 1999).

2.4.2 Ciclo de Krebs

O Ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos ocorre nas mitocôndrias e constitui a via comum de oxidação de moléculas combustíveis nas células em condições aeróbicas. A centralização se dá ao nível do acetil-CoA, produto comum da oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos.

No caso dos carboidratos, o ciclo se inicia com a descarboxilação oxidativa do piruvato em acetil-CoA, processo que ocorre no complexo piruvato desidrogenase (PDH) com a redução de NAD^+ a NADH/H^+ . Com a atuação da enzima citrato-sintase, ocorre a condensação do acetil-CoA com o ácido oxaloacético para formar o ácido cítrico. A aconitase catalisa então, por um processo reversível de duas etapas, a formação de isocitrato a partir do citrato, molécula proquiral, que age assimetricamente, mantendo dessa forma o esqueleto carbônico das moléculas que lhe deram origem. Posteriormente, o isocitrato é oxidado a α -cetoglutarato e CO_2 pela isocitrato desidrogenase (IDH) ligada ao NAD^+ , enzima alostérica que é ativada pelo ADP (perda de C1 oxaloacetato), gerando NADH/H^+ . O α -cetoglutarato sofre outra descarboxilação oxidativa a succinil-CoA com produção de NADH/H^+ (perda de C₄ oxaloacetato). A succinil-CoA reage com GDP e fosfato inorgânico para formar succinato livre e GTP. O succinato é a seguir oxidado a fumarato pela succinato desidrogenase, uma enzima de flavina, reduzindo-se FAD a FADH_2 . O fumarato, uma molécula simétrica, é hidratado pela fumarase a malato, o qual é oxidado pela malato desidrogenase ligado ao NAD^+ para regenerar o oxaloacetato, formando NADH/H^+ . Este pode então combinar com outra molécula de acetil-CoA e iniciar outra revolução do ciclo.

Os intermediários do ciclo também são utilizados na biossíntese como precursores. Estes intermediários são então repostos pelas reações

anapleróticas, sendo a mais importante a carboxilação irreversível do piruvato a oxaloacetato pela enzima piruvato carboxilase. Este oxaloacetato pode seguir o ciclo de Krebs ou ser convertido novamente a piruvato pela ação combinada das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e PK ou mediante a ação da enzima málica (Marzzoco; Torres, 1999).

A utilização de isótopos radioativos e estáveis como intermediários de carbono marcado, estabeleceram que o ciclo de Krebs é o principal mecanismo de degradação oxidativa dos carboidratos e de outros combustíveis nas células intactas. Uma das técnicas de eleição utilizadas no entendimento da cinética do ciclo de Krebs, fluxos metabólicos e acoplamento entre vias utilizando isótopos estáveis marcados é a ressonância magnética nuclear (RMN).

2.4.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear e análise de isotopômeros de ^{13}C

A ressonância magnética foi descoberta no final dos anos de 1930, foi aplicada em 1945 por físicos, procurando medir momentos magnéticos nucleares com maior precisão, sendo Bloch e Purcell ganhadores do prêmio Nobel de física em 1952. Posteriormente viria a interessar os químicos, sendo de 1951 o primeiro registro de sinais de ressonância magnética dos núcleos ^1H do álcool etílico (Arnold; Packard, 1951).

As técnicas de ressonância magnética nuclear fundamentam-se na absorção seletiva de ondas de rádio por amostras colocadas em um campo magnético. A amostra excitada, de forma suave devido à baixa energia dos fótons, regressa ao estágio inicial emitindo energia radiante no domínio das radiofrequências. A determinação precisa destas radiofrequências emitidas e da velocidade com que a amostra regressa ao seu estágio de partida (relaxação), são essenciais para informações tanto sobre a estrutura molecular da amostra, como sobre a dinâmica interna e global de suas moléculas.

As técnicas de espectroscopia RMN possuem um mundo de aplicações, como na identificação de misturas e na elucidação estrutural de substâncias, estudo de mobilidade e flexibilidade de moléculas, cinética de reações

químicas, caracterização de sólidos, obtenção de imagens internas de amostras. Uma das aplicações é a de particular interesse neste trabalho é o estudo do metabolismo utilizando núcleos magnéticos como marcadores de vias metabólicas, em particular o isótopo ^{13}C (Gil; Geraldles, 2002).

Muitos são os estudos que ilustram a viabilidade da utilização da magnetização do núcleo ^{13}C no entendimento do processo metabólico em sistemas vivos. Com a utilização da baixa abundância natural, ou na sua maioria com a administração de substratos enriquecidos em ^{13}C , espectros de alta resolução têm sido obtidos para identificação de intermediários metabólicos e produtos de leveduras (den Hollander et al., 1979; Galazzo; Bailey, 1989), microrganismos (Mackenzie et al., 1983; Nicolay et al., 1982; Ugurbil et al., 1978), culturas celulares (Cohen et al., 1981; Malaisse et al., 2000), órgãos perfundidos como fígado (Cohen et al., 1979; Sillerud; Shulman, 1983), corações (Bailey et al., 1981; Carvalho et al., 2004) e também órgãos *in vivo* (Alger et al., 1981; Neurohr et al., 1983).

Como o metabolismo ocorre por vias bem definidas, os átomos de carbono dos diversos metabólitos intermediários se tornam marcados, de uma maneira dependente de reações enzimáticas e em uma taxa de marcação determinada pelo fluxo metabólico e tamanho do reservatório ("pool sizes") dos mesmos. No espectro de ^{13}C , as ressonâncias atribuídas a carbonos específicos de um intermediário são identificados pelo seu desvio químico e também permite monitorar a ligação ou quebra de ligações a partir da observação do acoplamento escalar spin-spin ^{13}C - ^{13}C , que permitem a identificação de pares de núcleos ^{13}C no esqueleto de carbonos. A área do pico de ressonância é proporcional ao conteúdo de ^{13}C de um determinado carbono e o seu enriquecimento pode ser calculado se a concentração total do intermediário é conhecida.

A escolha de substratos para o estudo metabólico de um tecido ocorre a partir do substrato de preferência do mesmo, por exemplo, ácidos graxos para o tecido cardíaco e glicose no caso do cérebro. Mistura de substratos também são frequentemente utilizadas (Carpenter et al., 2015; Li et al., 2011). A utilização da espectroscopia RMN permite a quantificação da oxidação de múltiplos compostos tanto em condições de estado estacionário metabólico ("steady state") (Buescher et al., 2015), como na ausência desta condição

(“nonsteady state”) (Leighty; Antoniewicz, 2011). Em muitos casos a interpretação direta dos padrões de marcação (sem análise de fluxo metabólico), é suficiente para fornecer informações relativas às atividades das vias metabólicas, mudanças qualitativas de suas distribuições por rotas alternativas e a contribuição na formação de diferentes metabólitos (Leighty; Antoniewicz, 2011).

A monitoração do ciclo de Krebs com marcadores enriquecidos com ^{13}C exige a compreensão das reações que envolvem os intermediários do ciclo. É importante dessa forma o conhecimento da origem de cada carbono de cada intermediário, no intuito de traçar a origem da marcação. O termo isotopômero em pesquisa metabólica se refere a metabólitos que diferem uns dos outros pela distribuição isotópica, no caso de isotopômeros de ^{13}C , a diferenciação ocorre pela distribuição de ^{13}C entre os carbonos da molécula em questão. A distribuição completa de todos os isotopômeros de uma molécula de n carbonos é 2^n . A base da potência refere o número de isótopos distintos do núcleo considerado (2 neste caso, podendo ser ^{12}C ou ^{13}C) enquanto o expoente refere o número de posições que cada isótopo pode ocupar (equivalente no caso ao número de carbonos do metabólito). Por exemplo, a molécula de oxaloacetato possui um total de 16 (2^4) isotopômeros. A distribuição de isotopômeros de um determinado intermediário metabólico está intimamente ligada ao conjunto de vias metabólicas que os origina e ao padrão original de marcação do substrato usado. Dessa forma ^{13}C RMN é capaz de fornecer dados quantitativos de isotopômeros individuais ou grupos de isotopômeros para análise da dinâmica metabólica utilizando modelos matemáticos de metabolismo (Li et al., 2011).

2.4.4 Metabolismo e doença renal crônica

O rim é o órgão responsável pela metabolização e excreção de um grande número de substratos, dessa forma a diminuição da função renal e da função metabólica na condição de doença renal crônica repercute sistemicamente. As alterações incluem desequilíbrios ácido-base, homeostase

de água e eletrólitos, alteração do metabolismo de glicose, aminoácidos e lipídios, acúmulo de compostos nitrogenados não proteicos e diminuição parcial de funções endócrinas (Rhee et al., 2015).

Diversos estudos demonstram o sucesso da utilização da espectroscopia RMN em amostras de plasma, urina e de outros biofluidos na verificação de alterações metabólicas em condições de doença. Tais estudos permitiram a identificação de alterações em metabólitos específicos e a sua validação como biomarcadores na previsão de progressão de doenças tais como o diabetes mellitus e doenças cardiovasculares (Brindle et al., 2003; Hwang et al., 2010; Kirschenlohr et al., 2006).

Estudos relacionados a análises metabolômicas na condição de doenças renais experimentais ou estudos clínicos são encontrados na literatura. Aplicações em modelos animais de injúria renal aguda, com a análise dos perfis metabonômicos séricos e renais (córtex e medula) após isquemia/reperfusão bilateral encontrou alterações de concentrações de metabólitos séricos que podem ser utilizados como diagnóstico no período em que os marcadores de rotina (ureia e creatinina) ainda não estão alterados. Nos rins foram encontradas nos períodos iniciais alterações que demonstram alterações na glicólise com as diminuições de glicose e lactato, um marcante acúmulo de citrato, indicativo de bloqueio no ciclo de Krebs e outras alterações relacionadas ao metabolismo de purinas e do processo inflamatório (Wei et al., 2014).

Análises dos perfis metabólicos plasmáticos de pacientes renais crônicos identificaram modificações em diversos metabólitos, entre eles: moléculas relacionadas ao metabolismo do triptofano, como indoxil sulfato, ácido quinurênico, quinurenina e outros como intermediários do ciclo de Krebs, aconitato e isocitrato (Goek et al., 2013; Rhee et al., 2013; Yu et al., 2014).

Outro ponto importante é a acidose metabólica na DRC. Os rins são responsáveis pela manutenção de níveis estáveis séricos de bicarbonato, com a reabsorção do bicarbonato filtrado e síntese de bicarbonato suficiente para neutralizar a carga ácida endógena. Dessa forma, quando a função renal está comprometida, uma redução primária do bicarbonato sérico pode ocorrer. A acidose aumenta a produção de aldosterona, endotelina e angiotensina 2, fatores envolvidos na promoção de lesão renal e fibrose. Além disso, a

diminuição do pH intersticial e intracelular estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias; aumento da produção renal de amônia com ativação do sistema complemento que da mesma forma vão contribuir para lesão renal e fibrose.

As consequências da acidose metabólica incluem: aumento da degradação proteica muscular, supressão do crescimento infantil, diminuição da síntese de albumina com pré-disposição para hipoalbuminemia, estímulo da inflamação e comprometimento da secreção e resistência à insulina (Kraut; Madias, 2010; Kraut; Madias, 2016).

2.5 METABOLISMO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Nas glândulas salivares o processo secretório é sabidamente dependente de energia, sendo a principal fonte a glicose. Os poucos estudos encontrados na literatura baseiam-se no consumo de oxigênio, consumo de glicose e produção de lactato de fatias de glândulas incubadas em diferentes condições, e na incorporação de glicose exógena marcada (isótopo radioativo) durante o processo metabólico destas mesmas fatias de glândula (Nicolau; Sasaki, 1976; Nicolau; Sasaki, 1983; Pedroso et al., 1976).

Alterações no metabolismo de carboidratos em glândulas salivares de ratos foram observadas no diabetes induzido por estreptozotocina. Na glândula parótida foi demonstrado um aumento na atividade da enzima hexoquinase. Na glândula submandibular foi observada redução na atividade da enzima hexoquinase e um aumento das atividades da fosfofrutoquinase-1 (Nicolau et al., 2006; Nogueira et al., 2005). Outro estudo avaliou as atividades enzimáticas de enzimas chaves da glicólise, via das pentoses fosfato e fermentação láctica de glândulas salivares de ratos em diferentes períodos de desenvolvimento (Nicolau et al., 2003).

Alterações do metabolismo do glicogênio foram avaliadas nas glândulas salivares. No diabetes induzido por estreptozotocina, foi observado aumento da atividade da enzima glicogênio sintase, com um aumento no conteúdo total de glicogênio nas glândulas parótida e submandibular (Nicolau et al., 2005). Um

estudo recente encontrou acúmulo de glicogênio em glândulas salivares de ratos tratados com íon lítio (Souza et al., 2016).

A avaliação metabólica é fundamental para compreensão funcional dos diferentes tecidos, incluindo as glândulas salivares em condições de homeostase e nas diversas disfunções locais e sistêmicas possíveis. Não é do nosso conhecimento qualquer estudo que tenha avaliado o metabolismo em glândulas salivares na condição de doença renal crônica. Portanto nosso objetivo proceder a uma avaliação metabólica das glândulas salivares num modelo de DRC usando a metodologia de análise de isotopômeros de ^{13}C por ressonância magnética nuclear.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivo verificar as possíveis alterações na morfologia, no sistema antioxidante, no metabolismo de carboidratos e também proceder à análise iônica de glândulas salivares parótida e submandibular de ratos com nefropatia crônica induzida por 5/6 de nefrectomia comparando com grupos controle.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar alterações histológicas nos rins e nas glândulas salivares submandibulares e parótida;
- Analisar a presença de dano oxidativo nas glândulas parótida e submandibular através da quantificação do marcador de dano lipídico MDA, o malondialdeído;
- Avaliar parte do sistema antioxidante enzimático através das determinações das atividades enzimáticas da catalase e peroxidase;
- Determinar as atividades das enzimas chave da glicólise: hexoquinase, fosfofrutoquinase-1 e piruvato quinase; da via das pentoses fosfato: glicose-6-fosfato desidrogenase; e da fermentação láctica: lactato desidrogenase;
- Caracterizar metabolicamente as glândulas submandibulares e parótidas em repouso e com estímulo da salivação através de análises por Ressonância Magnética Nuclear usando substratos enriquecidos em ^{13}C ;
- Analisar o conteúdo de glicogênio nas glândulas parótida e submandibular;
- Analisar o conteúdo dos íons cálcio, fósforo e sódio das glândulas submandibulares e parótida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Esse projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética para o uso de animais (CEUA) da FOUSP (Pareceres 19/2013 e 16/2014) (Anexo A).

Para obtenção dos resultados apresentados foram utilizados 168 ratos da raça Wistar, mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOUSP, com peso inicial de 250 gramas aproximadamente. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento, ciclo constante de 12hs claro/12hs escuro e temperatura ambiente controlada em 24 °C.

Os animais foram divididos em três grupos com tempo experimental de 12 semanas:

- DRC** - indução da Nefropatia Crônica;
- Sham** - controle positivo no qual foi avaliado o efeito do procedimento cirúrgico;
- Controle** - controle negativo;

4.2 INDUÇÃO DA NEFROPATIA

A indução da nefropatia crônica foi realizada utilizando o método de ablação de 5/6 da massa renal que em ratos possui metodologia já bem estabelecida (Bergamaschi et al., 1997). Os ratos dos grupos DRC com aproximadamente 250g de peso corporal foram anestesiados com Dopalen (Vetbrands) na dose de 80mg/Kg p.c. e Anasedan (Vetbrands) na dose de 20 mg/Kg p.c. Foi realizada remoção de pelos da região ventral e, após a verificação da ausência de sensibilidade dolorosa e reflexos, foi realizada laparotomia, ablação de 5/6 da massa renal por ligadura dos ramos anterossuperior e posterior da artéria renal esquerda, com auxílio de um

microscópio cirúrgico (Zeiss) e nefrectomia total direita com ligadura do hilo renal. Posteriormente sutura em dois planos (muscular e pele) (Figura 4.1). O grupo Sham foi submetido à simulação do procedimento cirúrgico sem ocorrência de lesão tecidual e o controle não sofreu nenhum procedimento inicial.

Figura 4.1 - Sequência cirúrgica dos 5/6 de nefrectomia. Os animais são anestesiados, tricotomizados, feita laparotomia, nefrectomia total direita, ligadura dos ramos posterior e ântero superior da artéria renal esquerda. Podemos observar imediata isquemia tecidual, prévio à sutura do animal

4.3 COLETA E ANÁLISES EM GAIOLA METABÓLICA

Para análises em gaiola metabólica foram utilizados 10 animais de cada grupo experimental, mantidos pelo período de 24 horas prévio ao sacrifício. Foram feitas coletas de amostras de urina e medições dos volumes urinários e de água ingerido. As amostras de urina foram centrifugadas a 1540 x g por 10 minutos a 4°C e armazenadas em gelo até o momento das análises.

4.3.1 Análises das amostras de urina

4.3.1.1 Concentração urinária de ureia e excreção de ureia em 24 horas

Para determinação da concentração urinária de ureia foi utilizado o kit comercial Ureia CE da Labtest®. A ureia contida nas amostras foi hidrolisada pela urease a íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade da cor formada foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm e um padrão contendo 70mg/dL foi utilizado para o cálculo das concentrações das amostras. As amostras de urina foram diluídas 1:50 para análise e o cálculo da excreção de ureia em 24 horas foi feito com a fórmula:

$$\text{Ureia (mg/24 horas)} = \frac{\text{Concentração de ureia(mg/dL)} \times \text{volume de 24 horas}}{100}$$

4.3.1.2 Concentração urinária de creatinina

Para determinação da concentração de creatinina urinária, foi utilizado o kit comercial creatinina K da Labtest® que possui reação por cinética de dois pontos. A creatinina contida nas amostras de soro reage com o picrato alcalino formando um complexo de cor vermelha, sendo assim, a variação da absorbância lida pelo espectrofotômetro (520nm) é proporcional à concentração de creatinina na amostra. Um padrão contendo 4mg/dL foi utilizado para o cálculo das concentrações desconhecidas. Para análise da urina, as amostras foram diluídas 1:25 e os resultados obtidos foram posteriormente utilizados no cálculo da depuração de creatinina.

4.3.1.3 Concentração de proteínas totais

Para determinação da concentração de proteínas totais na urina foi utilizado o método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando albumina bovina como padrão. As amostras foram diluídas 1:50 e as leituras de absorbância foram efetuadas a 660 nm em espectrofotômetro Beckman DU-800. As concentrações de proteína na urina foram calculadas (mg/mL) e posteriormente foi feito o cálculo da proteinúria 24 horas, multiplicando o resultado anteriormente obtido pelo volume urinário obtido neste período.

4.4 COLETA E ANÁLISE DE AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras de sangue foram coletadas de todos os animais, independente do tipo de análise tecidual realizada. Foi utilizada punção cardíaca e as amostras coletadas foram armazenadas em baixa temperatura em tubos contendo EDTA a 15%. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1.540 x

g por 10 min. a 4°C para separação do soro das células sanguíneas e o soro foi mantido em geladeira até o momento das análises.

4.4.1 Concentração sérica de ureia

Para determinação da concentração sérica de ureia foi utilizado o kit comercial Ureia CE da Labtest® conforme anteriormente descrito. Os resultados foram expressos em mg/dL.

4.4.2 Concentração sérica e depuração de creatinina em 24 horas

Para determinação da concentração sérica de creatinina foi utilizado o kit comercial ureia CE da Labtest® conforme anteriormente descrito. Foram feitos os cálculos das concentrações, expressos em mg/dL e nos animais que também continham análise urinária, o cálculo da *depuração* de creatinina com a seguinte fórmula, onde 1440 corresponde aos minutos de 24 horas:

$$\text{Depuração creatinina (mL/min)} = \frac{\text{Creatinina urina (mg/dL)} \times \text{volume urina mL}}{\text{Creatinina soro (mg/dL)} \times 1440}$$

4.5 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Com o intuito de avaliar as alterações histológicas no rim e nas glândulas parótidas e submandibulares, 12 semanas após a cirurgia, os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (60 e 20 mg/Kg - Vetbrands, Brasil) e feita a cuidadosa remoção das glândulas parótidas e submandibulares e do rim esquerdo. Os tecidos foram lavados em tampão PBS

e fixados em soluções diferentes. As glândulas parótidas foram fixadas em solução 2% glutaraldeído e 2,5% formaldeído em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, permaneceram por 4 horas em temperatura ambiente em constante e lenta movimentação e posteriormente *overnight* a 4°C. As glândulas submandibulares foram fixadas utilizando dois fixadores: uma glândula foi fixada com o mesmo fixador utilizado na parótida e a outra foi fixada na solução de Carnoy para melhor preservação dos ductos granulosos. Os rins foram fixados no líquido de Bouin. Após 30 minutos em solução, os mesmos foram seccionados ao meio e permaneceram por 48 horas a 4°C em solução.

As glândulas salivares fixadas foram lavadas em tampão fosfato de sódio 0,05M e todos os tecidos sofreram desidratação em uma série crescente de alcoóis, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina. Após todo este processo foram obtidas seções de 3 e 4 µm para futuras colorações.

4.5.1 Contagens de ductos glandulares e glomérulos

Os cortes histológicos das glândulas parótida e submandibular e dos rins foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Nas glândulas salivares foram realizadas análises com a contagem de ductos em 10 campos aleatórios em aumento x400 por animal. O córtex renal foi avaliado pela contagem de glomérulos em 10 campos aleatórios em aumento x200 por animal. Os resultados foram apresentados com as médias e erros padrões, utilizando n=3 em ambas as análises. Nestas análises foi utilizada a espessura de corte de 3 µm.

4.5.2 Coloração de Tricômico de Mallory para avaliação de fibrose tecidual

Após desparafinização e hidratação, os cortes permaneceram na solução A (fuccina ácida) por 1 minuto e, posteriormente 5 minutos na solução

B (azul de anilina, orange G e ácido fosfotúngstico). Esta metodologia permite distinguir fibras colágenas coradas em azul e queratina em laranja. Foi utilizado n=6 por grupo e realizada análise qualitativa descritiva dos cortes.

4.5.3 Coloração de ácido periódico de Schiff

A coloração PAS (ácido periódico de Schiff) foi empregada nos cortes das glândulas parótida e submandibulares e rins. Após desparafinização e hidratação, os cortes permaneceram por 10 minutos em solução de ácido periódico a 1% por 10 minutos e lavados em água corrente. Posteriormente as lâminas foram coradas pelo reativo de Schiff por 20 minutos e novamente lavados em água corrente por 10 minutos. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 5 minutos.

A reação do ácido periódico oxida seletivamente os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff produzindo uma cor púrpura-magenta. Nas glândulas este processo de coloração foi utilizado para identificação de polissacarídeos (glicogênio) e comparação qualitativa entre os grupos experimentais. No caso dos rins, o propósito da utilização desta coloração foi identificação de alterações em membranas basais dos capilares glomerulares (glomeruloesclerose). Foi utilizado n=6 por grupo e feita análise qualitativa e descritiva dos cortes.

4.6 COLETA DE AMOSTRAS PARA ANÁLISES ENZIMÁTICAS

Para coleta das amostras, 12 semanas após a cirurgia os animais foram anestesiados com Ketamina e Xilazina (60 e 20 mg/Kg - Vetbrands, Brasil), as glândulas parótidas e submandibulares foram imediatamente removidas, limpas de tecidos aderentes e prensadas entre placas de alumínio, previamente mantidas em nitrogênio líquido para imediato congelamento. As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises.

4.6.1 Análise das atividades enzimáticas da amilase, peroxidase e catalase

Para análises das atividades enzimáticas da amilase, peroxidase e catalase, os tecidos foram pesados e homogeneizados a 10% em tampão fosfato de potássio (KH_2PO_4 50 mM e K_2HPO_4 50 mM) pH 7,4 e centrifugados a 1500 x g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram mantidos em gelo para análises imediatas.

4.6.1.1 Atividade da enzima Amilase

A atividade enzimática da amilase foi determinada pelo método de Fischer e Stein (Fisher; Stein, 1961). Alíquotas de homogenado foram incubadas com solução de amido 1% em tampão fosfato pH 7,0 (fosfato de potássio 20 mM e cloreto de sódio 0,7 mM) por cinco minutos a 37°C. A reação foi interrompida com 0,4 mL de uma solução de ácido dinitrossalicílico, em seguida os tubos eram mantidos em água fervente durante cinco minutos e, após o seu esfriamento as absorbâncias eram medidas a 530 nm, utilizando como padrão uma curva com solução de maltose 1mg/mL. Os resultados foram expressos em mg de maltose/mg de proteína.

4.6.1.2 Atividade da enzima Peroxidase

A atividade enzimática da peroxidase foi determinada pelo método de Chandra (Chandra et al., 1977) e modificado por Anderson (Anderson, 1986). Este método consiste da variação da absorbância 460 nm, em espectrofotômetro, de uma mistura do homogenado, tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0, o-dianisidina 10mM em metanol e H_2O_2 2,1mM . Foi usado como padrão uma curva de referência com uma solução de lactoperoxidase

1mg/mL com diluição 1:100. Os resultados foram expressos em μg de lactoperoxidase/mg de proteína.

4.6.1.3 Atividade da enzima Catalase

A atividade enzimática da catalase foi determinada pelo método descrito por Aebi (Aebi, 1984), o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 em espectrofotômetro a 240 nm durante 5 minutos. Os dados foram expressos em U de catalase/ mg de proteína.

4.6.2 Análises enzimáticas- Metabolismo da glicose

As amostras de glândulas salivares foram homogeneizadas a 10%, em meio contendo tampão imidazol 50 mmol/L, β - mercaptoetanol 1,0 mmol/L e EDTA 2,0 mmol/L em pH 7,0. Os homogenados foram centrifugados a 27850 x g durante 20 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para as determinações enzimáticas e quantificações de proteína total.

As atividades das enzimas estudadas foram determinadas pesquisando-se a oxidação de NADH ou NADPH, ou redução de NAD^+ ou NADP^+ . As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 340nm. A variação de absorbância resultou em um valor $\Delta A/\text{minuto}$, utilizado nos cálculos de atividade enzimática, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\Delta A/\text{min} \times V}{\epsilon \times d \times v} = \text{Unidades de atividade enzimática por mL de homogenado}$$

$\Delta A/\text{min}$ = variação de absorbância por minuto

ϵ = coeficiente de extinção molar das coenzimas reduzidas NADH ou NADPH a 340 nm (6,22cm/ μmol)

d = caminho óptico (1 cm)

v = volume do homogenado utilizado no ensaio

Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que converte 1,0 μmol de substrato por minuto, em condições de ensaio específicas. As atividades específicas foram expressas em U/mg de proteína.

4.6.2.1 Atividade da enzima Hexoquinase

A atividade da hexoquinase foi mensurada com o auxílio da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. O produto da reação catalisada pela HK, isto é, glicose-6-fosfato, será oxidada na presença de NADP^+ , que por sua vez se reduz, conforme ilustrado na figura 4.2 . A reação foi iniciada com a adição de uma alíquota de 20 μL de homogenado em meio contendo tampão imidazol 50,0 mmol/L pH 7,2, MgCl_2 4,7 mmol/L , ATP 5,0 mmol/L, glicose 1,1 mmol/L, NADP^+ 0,13 mmol/L e G6PD 0,3 U/mL (Uyeda; Racker, 1965).

Figura 4.2 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da hexoquinase

A atividade da PFK-1 foi determinada na presença de aldolase (ALDO), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GDH) e triose fosfato isomerase (TPI)

como enzimas auxiliares, conforme ilustrado na figura 4.3. A reação foi iniciada com a adição de 20 μL do homogenado e medida acompanhando-se a oxidação do NADH. O meio de reação possuía a seguinte composição: tampão trietanolamina 50,0 mmol/L pH 7,2, MgCl_2 4,83 mmol/L, EDTA 2,0 mmol/L, ATP 5,0 mmol/L, F-6-P (Na_2) 0,99 mmol/L, β -NADH 0,14 mmol/L, ALDO 0,54 U/ml, GDH 0,02 U/mL e TIM 0,04 U/mL. Para cada mol de substrato utilizado, dois moles de NADH foram oxidados de maneira que o valor da variação de absorbância foi dividido por dois (Mansour, 1965).

Figura 4.3 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da fosfofrutoquinase-1

4.6.2.2 Atividade da enzima Piruvato quinase

A atividade da piruvato quinase (PK) foi mensurada na presença da lactato desidrogenase (LDH) como enzima auxiliar de acordo com o método de Llorente (figura 4.4). A reação era iniciada pela adição de 20 μL de homogenado (diluição 1:10) em meio de reação contendo tampão imidazol 50,0 mmol/L pH

7,2, MgCl_2 4,83 mmol/L, PEP 4,16 mmol/L, NADH 0,14 mmol/L, KCl 100,0 mmol/L, ADP 1,1 mmol/L e LDH 1,2 U/mL (Llorente et al., 1970)

Figura 4.4 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da piruvato quinase

4.6.2.3 Atividade da enzima Lactato desidrogenase

A atividade da LDH foi determinada pela oxidação de NADH na reação de conversão de piruvato a lactato, através do método descrito por Bergmeyer e Bernt (1974) (figura 4.5). A diminuição da absorbância foi acompanhada a 340 nm, utilizando-se o seguinte meio de reação: tampão fosfato piruvato (fosfato de potássio monobásico 7,35 mmol/L, fosfato de potássio bibásico 34,08 mmol/L e piruvato de sódio 0,63 mmol/L) pH 7,5 e β -NADH 0,11mmol/L. A reação iniciava com a adição de uma alíquota de 10 μL de homogenado com diluição 1:10.

Figura 4.5 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da lactato desidrogenase.

4.6.2.4 Atividade da enzima Glicose-6-fosfato desidrogenase

A atividade da G6PD foi determinada pela formação de NADPH na reação catalisada por esta enzima onde a partir de glicose-6-fosfato obtém-se 6-fosfogliconolactona (figura 4.6). A velocidade de formação de NADPH foi mensurada pelo aumento da absorbância a 340 nm, no seguinte meio de reação: tampão tris-HCl 76,0 mmol/L em pH 7,4, MgCl₂ 3,34 mmol/L, NADP⁺ 0,13 mmol/L e glicose-6-fosfato 1,64 mmol/L. A reação iniciou com a adição de 20 µL de homogenado (Goldman et al., 1964).

Figura 4.6 - Esquema do método utilizado na determinação da atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase.

4.6.2.5 Concentração de proteínas totais

A concentração de proteína total das amostras de sobrenadante dos homogenizados glandulares foi determinada segundo o método de Lowry (Lowry et al., 1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. As leituras foram realizadas a 660 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg/mL.

4.7 AMOSTRAS PARA ANÁLISE METABÓLICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

4.7.1 Infusão de [U-¹³C]Glicose

Neste estudo utilizamos dois tipos de infusões com marcadores metabólicos em carbono 13 (¹³C). O primeiro foi com glicose uniformemente marcada ([U-¹³C]Glicose).

Doze semanas pós-cirurgias e separação dos controles, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitonal de Ketamina/Xilazina (60 e 20 mg/Kg de peso corporal). Verificado o efeito anestésico, foi realizada uma incisão na região anterior do pescoço, dissecação e exposição da veia jugular direita. Uma cânula medindo 1,0 mm de diâmetro foi introduzida nesta veia e fixada com fio de sutura ligado a uma seringa contendo solução de [U-¹³C]Glicose (200 mg/mL) dissolvida em solução salina (0,9%). Esta seringa foi colocada em uma bomba de infusão (11 Plus infusion pump, Harvard Apparatus, Holliston, MA) e programada para infundir um total de 1,0 mL em 3 horas (fluxo de 0,3 mL/hora). Uma dose inicial de 20 mg de [U-¹³C]Glicose foi administrada no início da infusão para permitir uma subida rápida dos níveis plasmáticos deste marcador metabólico.

A figura 4.7 esquematiza o padrão de marcação da metabolização da [U-¹³C]Glicose, onde o esqueleto carbônico das moléculas é representado por

círculos, sendo os preenchidos ^{13}C e os vazios ^{12}C . Nota-se a metabolização pela glicólise gerando 2 moléculas de $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Piruvato}$, que pode seguir para a fermentação láctica com a atuação da enzima lactato desidrogenase e formar o $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ ou adentrar a mitocôndria e formar $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2]\text{Acetil-CoA}$ com a atuação da enzima piruvato desidrogenase. Quando $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2]\text{Acetil-CoA}$ entra no ciclo de Krebs, será responsável pela marcação dos carbonos 4 e 5 do α -cetoglutarato e, conseqüentemente dará origem ao $[\text{4,5-}^{13}\text{C}_2]\text{Glutamato}$. Se este isotopômero de α -cetoglutarato permanecer no ciclo, dará origem a isotopômeros multimarcados de glutamato, como o $[\text{3,4,5-}^{13}\text{C}_3]\text{Glutamato}$ na segunda volta e eventualmente $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Glutamato}$ após múltiplas voltas do ciclo. Também nota-se no esquema uma via de anaplerose com o ciclo do piruvato, que será responsável pela formação de outras marcações ao nível de fosfoenolpiruvato, piruvato e conseqüentemente lactato. A carboxilação irreversível do piruvato a oxaloacetato ocorre com a atuação da enzima piruvato carboxilase, este oxaloacetato pode seguir o ciclo de Krebs ou ser convertido novamente a piruvato pela ação combinada das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e PK ou com a ação da enzima málica.

Figura 4.7 - Esquema da utilização de [U-¹³C]Glicose como marcador metabólico de carbono para monitorar funções da glicólise e ciclo de Krebs. As moléculas são representadas por seus esqueletos carbônicos, círculos vazios representam ¹²C e círculos pretos a ¹³C. [U-¹³C]Glicose originará duas moléculas de [U-¹³C]Piruvato (F1), o qual pode seguir à fermentação láctica com a atuação da enzima lactato desidrogenase (LDH), para formar [U-¹³C]Lactato (F2) ou seguem à incorporação de átomos ¹³C em intermediários do ciclo de Krebs (F3) e a sua cinética pode ser seguida através das marcações ¹³C nos multipletos do carbono 4 do glutamato. [1,2-¹³C₂]Acetil-CoA marca os carbonos 4 e 5 do α-cetoglutarato, consequentemente origina [4,5-¹³C₂]Glutamato (D45) e a combinação de [1,2-¹³C₂] Acetil- CoA com uma molécula de oxaloacetato previamente marcado gera outros multipletos ao nível de C4 glutamato. O ciclo do piruvato (F6) é responsável por outras marcações aos níveis do fosfoenolpiruvato (PEP), piruvato e, consequentemente, lactato. F4 representa o fluxo anaplerótico através da piruvato carboxilase e F5 indica o equilíbrio rápido entre o α-cetoácido piruvato e alanina catalisada pela alanina aminotransferase. Em cada satélite de ¹³CH₃-Lactato surge [U-¹³C]Lactato, linhas 1,3,4,5,6 e 8, que são distinguíveis devido às ²J_{HC}, ³J_{HC} e ³J_{HH}, dupletos de tripletos, já que ²J_{HC} e ³J_{HC} tem magnitudes semelhantes, e [2,3-¹³C₂]Lactato, linhas 2 e 7 são distinguíveis por ²J_{HC}. Na ressonância do carbono 2 do lactato podemos distinguir o quarteto Q, dubletos D₂₃ e D₁₂, além do singuleto S. Na ressonância do carbono 4 do glutamato temos o singuleto, essencialmente devido a abundância natural de ¹³C e o dupletos 4,5 distinguíveis devido a uma J_{C4-C5}.

4.7.2 Infusão de [1,6-¹³C₂]Glicose, [2-¹³C]Glicose e [U-¹³C]Ácidos graxos

Outra infusão realizada foi a representada na figura 8 onde se fez uso de uma mistura de substratos que incluiu 50 mg [1,6-¹³C₂]Glicose, 20 mg [2-¹³C]Glicose e 15 mg [U-¹³C]Ácidos graxos dissolvidos em solução de BSA 3%, seguindo o mesmo protocolo *in vivo* de infusão utilizado acima. Através desta mistura pretendeu avaliar-se a prevalência de fluxos metabólicos específicos, nomeadamente glicólise ([1,6-¹³C₂]Glicose), via das pentoses fosfato ([2-¹³C]Glicose) e contribuição dos ácidos graxos para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos ([U-¹³C]ácidos graxos).

A utilização da [1,6-¹³C₂]Glicose na monitoração da glicólise tem consideráveis vantagens associadas com a melhora da sensibilidade da técnica, já que ambas as trioses formadas serão marcadas, evitando a diluição de 50% que ocorre com marcadores que marcam apenas uma (por exemplo [1-¹³C]Glicose); além disso os multipletos ¹³C dos intermediários metabólicos decorrentes da metabolização deste marcador possuem número menor de ressonâncias, propiciando maior sensibilidade de detecção por ausência de separação extra de sinais devido a acoplamentos.

Como estamos trabalhando com um tecido com capacidade biossintética na produção dos componentes salivares, utilizamos a [2-¹³C]Glicose na tentativa de monitorar a via das pentose fosfato (F2), importante via de produção de equivalentes redutores (NADPH). Quando este marcador segue por esta via, gera marcações ao nível do lactato não explicáveis pela glicólise direta, sendo eles: [3-¹³C] e [1,3-¹³C₂]Lactato, como pode ser observado na figura 4.8.

Outro ponto importante é a monitoração da cinética do ciclo de Krebs (F4), sendo um ponto importante, as possíveis origens da Acetil-CoA. Como observamos na imagem, a Acetil-CoA proveniente da glicólise neste caso, seria [2-¹³C]Acetil-CoA que na primeira volta no ciclo marcará o carbono 4 do glutamato e em uma segunda volta dará origem ao [3,4-¹³C₂]Glutamato. A utilização de [U-¹³C]Ácidos graxos gera pós β-oxidação [1,2-¹³C₂]Acetil-CoA que será responsável pela marcação dos carbonos 4 e 5 do α-cetoglutarato e, conseqüentemente dará origem ao [4,5-¹³C₂]Glutamato em uma primeira volta

no ciclo e [3,4,5-¹³C₃]Glutamato na segunda volta. Dessa forma, a marcação do carbono 4 do glutamato sem marcação em carbono 5 indica a contribuição da glicólise e a marcação simultânea em carbono 4 e carbono 5 a contribuição do metabolismo dos ácidos graxos nas glândulas salivares (Tavares et al., 2015).

4.7.3 Estimulação das vias simpáticas e parassimpáticas

Com o objetivo de verificar o efeito do estímulo da salivação no metabolismo glandular, os animais foram divididos em dois grupos: repouso, os quais receberam a infusão dos marcadores pelo período de três horas; estimulado, os quais após duas horas de infusão, receberam uma injeção intraperitonal de Isoproterenol (5,0 mg/Kg de peso corporal) e Pilocarpina (1,0 mg/Kg de peso corporal) dissolvidos em solução salina (0,9%) e permaneceram mais uma hora em infusão, completando o total de três horas.

4.7.4 Coleta das amostras

Terminado o período de 3 horas de infusões dos marcadores, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e imediatamente as glândulas salivares submandibulares e parótidas foram removidas, limpas de tecidos aderentes e imersas em nitrogênio líquido para o imediato congelamento e preservação dos metabólitos produzidos pelos tecidos. As amostras foram mantidas em freezer -80°C até o momento das análises.

Figura 4.8 - Esquema metabólico da utilização de $[1,6-^{13}\text{C}_2]\text{Glicose}$, $[2-^{13}\text{C}]\text{Glicose}$ e $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{Ácidos graxos}$, como marcadores metabólicos de carbono para monitorar as funções da glicólise, via das pentose fosfato e ciclo de Krebs. As moléculas são representadas por seus esqueletos carbônicos, círculos vazios representam ^{12}C e círculos pretos a ^{13}C . A $[1,6-^{13}\text{C}_2]\text{Glicose}$ originará duas moléculas de $[3-^{13}\text{C}]\text{Piruvato}$ na glicólise (F1), o qual pode seguir para a fermentação láctica pela ação da enzima lactato desidrogenase (F3), originando duas moléculas de $[3-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ ou seguir para incorporação de ^{13}C nos intermediários do ciclo de Krebs (F4) e a sua cinética pode ser seguida através das marcações ^{13}C nos multipletos do carbono 4 do glutamato. Com origem glicolítica, teremos a $[2-^{13}\text{C}]\text{Acetil-CoA}$ que marca o carbono 4 do α -cetoglutarato, conseqüentemente origina $[4-^{13}\text{C}]\text{Glutamato}$ (C4S) e a combinação de $[2-^{13}\text{C}]\text{Acetil-CoA}$ com uma molécula de oxaloacetato previamente marcado gera outros multipletos ao nível C4 glutamato, como o $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ em uma segunda volta no ciclo. A partir da β -oxidação com a metabolização do $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{Ácidos graxos}$, teremos a formação de $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetil-CoA}$. Se esta molécula for incorporada aos intermediários do ciclo de Krebs marcará os carbonos 4 e 5 do α -cetoglutarato, conseqüentemente formará $[4,5-^{13}\text{C}_2]\text{Glutamato}$ em uma primeira volta no ciclo e $[3,4,5-^{13}\text{C}_3]\text{Glutamato}$ em voltas subseqüentes. A utilização da $[2-^{13}\text{C}]\text{Glicose}$, se metabolizada pela via das pentose fosfato (F2), originará isotopômeros que podem ser observados ao nível de Lactato ($[3-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ e $[1,3-^{13}\text{C}_2]\text{Lactato}$).

4.8 ANÁLISES ^1H E ^{13}C DE EXTRATOS GLANDULARES POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

4.8.1 Extração de metabólitos das glândulas salivares

Para a liberação dos metabólitos contidos nas glândulas salivares, as amostras foram tratadas com ácido perclórico, PCA a 6%.

Cada glândula, ainda congelada, foi macerada com a ajuda de gral e pistilo (supergelados, imersos em nitrogênio líquido). Ao pó obtido foi adicionado 1,0 mL de PCA e novamente macerados juntos, ainda imersos em nitrogênio líquido. Este pó foi transferido para um tubo plástico e adicionados mais 1,0 mL de PCA de tal forma que o tecido foi descongelado já imerso no ácido. Este conjunto foi vigorosamente agitado em um agitador vórtex e mantido em geladeira por 12 horas. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas a $1.300 \times g$ por 10 minutos a 4°C e separados os sobrenadantes.

Os sobrenadantes obtidos foram neutralizados com KOH em diferentes concentrações, utilizando-se um pHmetro digital (até o pH 6,8). Todo o

processo foi realizado em gelo picado para evitar o aquecimento da amostra. Esta solução foi mantida *overnight* em geladeira para permitir a precipitação de todo o sal formado (perclorato de potássio). Decorrido este período, foi novamente centrifugado a $1.300 \times g$ por 10 minutos a 4°C , cuidadosamente separados os sobrenadantes e colocados em novos tubos.

Os sobrenadantes com os metabólitos extraídos foram então liofilizados e armazenados em dissecadores até o momento das análises. Para esta análise cada amostra foi ressuspensa em $180 \mu\text{L}$ em água deuterada (D_2O , 99.9%) e $45 \mu\text{L}$ de fumarato de sódio 10mM, sendo este último utilizado como um padrão interno da amostra e para o cálculo das concentrações dos outros metabólitos.

4.8.2 Extração de glicogênio para análise por ^1H RMN

As glândulas foram liofilizadas e tratadas com KOH 30% (8,0 mL/grama de tecido) a 70°C por 30 minutos. A mistura foi tratada com Na_2SO_4 (4,0 mL/grama de tecido) e etanol 99,9% (25 mL/grama de tecido) e deixado *overnight* a 4°C para precipitação do glicogênio. Após centrifugação, a fase líquida superior foi descartada e o resíduo sólido foi seco. Este resíduo foi dissolvido em 2,0 mL de água destilada e acrescentado 1,0 mL de clorofórmio no intuito de remover os lipídios contidos na amostra e permitir a atuação enzimática da aminoglicosidase. Promovemos a centrifugação para separação de fases e secagem da fase aquosa inferior. Este resíduo foi ressuspensa em tampão acetato (0,05 M pH 4,5) e adicionados por amostra 16 unidades internacionais (UI) de aminoglicosidase de *Aspergillus Niger* (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas a 55°C *overnight*, centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e seco. As amostras contendo resíduo de glicose seco foram ressuspensas em $180 \mu\text{L}$ em água deuterada (D_2O , 99.9%) e $45 \mu\text{L}$ de fumarato de sódio 10 mM, sendo este último utilizado como um padrão interno da amostra e para o cálculo das concentrações de glicose de cada amostra (Soares et al., 2009).

4.8.3 Análises de Próton (^1H) e Carbono 13 (^{13}C) por RNM

Os espectros de desacoplamento dos spins de ^1H e ^{13}C dos extratos aquosos foram obtidos em um espectrômetro Varian VNMRs 14.1 Tesla (600MHz) equipado com uma sonda “broadband” (banda larga) de 3mm do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade de Coimbra.

Cada espectro de ^1H era composto por 65.000 pontos definindo uma largura espectral de 7,2 kHz. Foi utilizado um pulso de radiofrequência de 30° com um tempo de repetição interpulso de 10s para garantir o relaxamento completo de todos os núcleos na amostra. Foi utilizado um total de 64 leituras para garantir uma razão sinal/ruído adequado para análise quantitativa por deconvolução. Antes da transformada de Fourier, cada decaimento livre induzido foi multiplicado por uma função de apodização lorentziana de 0,2 Hz.

Cada espectro de ^{13}C era composto por 131.000 pontos definindo uma largura espectral de 37 kHz. Foi utilizado um pulso de radiofrequência de 45° com um tempo de repetição interpulso de 3s para garantir o relaxamento total dos átomos de carbono alifáticos metabolicamente mais relevantes na amostra. O número de leituras variou entre 10.000 a 20.000 para garantir uma razão sinal/ruído adequada que garanta a quantificação dos multipletos de ^{13}C . Antes da transformada de Fourier, cada decaimento livre induzido foi multiplicado por uma função de apodização lorentziana de 1,0 Hz.

A deconvolução espectral para análise quantitativa dos espectros foi realizada pelo software NUTSproTM RMN (Acorn, Freemont, CA), o qual permitiu a determinação das áreas abaixo das curvas de cada metabólito selecionado.

Os metabólitos analisados nos espectros ^1H foram: $^{12}\text{CH}_3$ -lactato (dubleto, 1,33 ppm), $^{13}\text{CH}_3$ -lactato (multipeto, 1,40 ppm), $^{12}\text{CH}_3$ -alanina (dubleto, 1,45 ppm), $^{12}\text{CH}_3$ -acetato (singleto, 1,9 ppm), $^{13}\text{CH}_3$ -acetato (singleto, 1,79 ppm *2), $^{12}\text{CH}_2$ -succinato (singleto, 2,38 ppm), $^{12}\text{CH}_3$ -creatina (singleto, 3,02 ppm), ^{12}C -glicose (dubleto, 5,22 ppm) e $^{12}\text{CH}_2$ -fumarato (singleto, 6,5 ppm; referência interna).

Os metabólitos analisados nos espectros ^{13}C RMN foram: C3-lactato (20,8 ppm), C2-lactato (69,1 ppm), C3-alanina (17,0 ppm), C3-acetato (24,0 ppm), C4-glutamato (34,2 ppm) e C3-glutamato (27,8 ppm).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DO MALONDIALDEÍDO

Para quantificação de malondialdeído, as amostras de glândulas salivares foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,4 M (0,1 g/0,350 mL), centrifugadas a 27,000 x g por 10 minutos a 4°C. Uma parte do sobrenadante foi utilizada para dosagem de proteína total e o restante foi neutralizado utilizando K_2CO_3 . Foi feita uma nova centrifugação a 27,000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -80°C até o momento das análises. As análises foram realizadas em HPLC, com uma coluna C18 (15 cm x 4,6 mm x 3 μm). A Fase Móvel utilizada foi KH_2PO_4 (50 mM): Metanol (65:35), com fluxo 0,6 mL/min, a 254nm com tempo de retenção aproximado de 3,0 minutos. Uma curva padrão de MDA foi preparada e utilizada no cálculo das concentrações das amostras (Karatas et al., 2002). Os dados foram expressos em μmol de MDA/mg de proteína.

4.10 DETERMINAÇÃO DO GLICOGÊNIO GLANDULAR

Para determinação do glicogênio glandular foi utilizado o método descrito por Sing em 1976 (Singh et al., 1976). As amostras de glândula foram digeridas em solução de KOH 30% em banho fervente por 30 minutos. O isolamento do glicogênio foi feito através da adição de uma solução saturada de sulfato de sódio (Na_2SO_4) e etanol a 95%. A mistura foi mantida a 4°C por 15 minutos e posteriormente centrifugada a 3020 x g por 20 minutos a 4°C. O precipitado passou por um processo de purificação utilizando o ácido tricloroacético (Kirschenlohr; Griffin, 2006) 5% como agente desproteinizante, etanol absoluto, solução etanol/éter 3:1 e finalmente o éter absoluto. Entre

cada tratamento as amostras eram centrifugadas a 3020 x g por 20 minutos a 4°C com descartes dos sobrenadantes. O sedimento final foi diluído em água destilada e as dosagens das amostras e do padrão contendo 0,02 mg de glicose foi feito utilizando o método da antrona utilizando solução de antrona 0,2% em ácido sulfúrico. Após banho fervente por 10 minutos, as absorbâncias foram lidas a 620 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em µg/mg de tecido.

4.11 ANÁLISES IÔNICAS

As concentrações dos íons cálcio, sódio e fósforo foram medidas através da espectrometria de emissão óptica com fonte de excitação de argônio induzido (ICP- OES 700 series, Agilent Technologies, CA, Santa Clara, EUA). Resumidamente, esta técnica utiliza radiofrequência para produzir um campo magnético responsável pela ionização do gás argônio, criando um plasma com alta temperatura. Os átomos ou íons da amostra colidem com os elétrons e íons do plasma, atingindo um estado excitado. Ao retornar para um estado não excitado, são emitidos fótons com comprimentos de onda específicos para cada elemento químico, e sua intensidade está relacionada à concentração do elemento na amostra. Os fótons são captados por um fotodetector e convertidos em um sinal elétrico, cujo valor de concentração é calculado a partir de curvas de calibração. Os comprimentos de onda utilizados foram: 393,366 nm para o cálcio, 588,995 nm para o sódio e 177,434 nm para o fósforo.

As amostras glandulares passaram pelo processo de digestão ácida em ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio (30%) para remover os compostos orgânicos presentes. O volume das solubilizações foi completado até 10 mL, seguindo-se filtração e armazenamento a 4°C até o momento das análises. Os dados foram expressos em PPM/mg de tecido.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas análises foram submetidos ao teste de normalidade. Posteriormente foram submetidos à análise de variância e teste de contraste de Tukey. Foi utilizado também o teste t de student para analisar o efeito da estimulação salivar. Em todos os testes foi admitida significância de 5% utilizando o software SPSS 16.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

A tabela 5.1 apresenta as médias e desvios padrões de pesos inicial e final dos animais, os resultados das análises séricas e da utilização da gaiola metabólica. Inicialmente não existem diferenças entre os grupos nos pesos dos animais, porém ao final do tempo experimental, notamos diferenças entre os três grupos experimentais, onde o grupo Sham apresenta média de peso final inferior ao grupo controle ($p<0,001$) e o grupo DRC apresenta média inferior aos grupos Controle e Sham ($p<0,001$).

Em relação às análises séricas, foram observados aumentos significativos das concentrações de ureia e creatinina no grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham ($p<0,001$).

A utilização da gaiola metabólica possibilitou a observação de alterações significativas no grupo DRC comparando com grupos Controle e Sham. Foi observado aumento significativo do volume urinário ($p<0,001$), diminuições significativas das concentrações urinárias de ureia e creatinina ($p<0,001$), aumentos significativos da excreção de ureia e de proteínas em 24 horas ($p<0,01$) e diminuição significativa da depuração de creatinina ($p<0,01$). Além disso, notamos aumentos significativos da ingestão de água ($p<0,001$) e do peso relativo do rim ($p<0,01$).

Tabela 5.1 - Médias e desvios padrões dos pesos inicial e final, análises séricas e da utilização da gaiola metabólica dos grupos Controle, Sham e DRC. n = número de animais por grupo; ** significa $p < 0,01$ comparando com grupos Controle e Sham; *** significa $p < 0,001$ comparando com grupos Controle e Sham; # significa $p < 0,001$ comparando com o grupo Controle.

	Controle	Sham	DRC
Peso inicial (g)	245,32 ± 8,31 n=56	246,77 ± 9,55 n=54	244,43 ± 11,30 n=58
Peso final (g)	410,64 ± 53,40 n=56	367,05 ± 30,79 # n=54	337,05 ± 55,61 *** n=58
Ureia soro (mg/dL)	29,84 ± 6,78 n=56	31,87 ± 8,72 n=54	71,23 ± 31,37 *** n=58
Creatinina soro (mg/dL)	0,69 ± 0,21 n=38	0,79 ± 0,28 n=38	1,21 ± 0,39 *** n=41
Ureia urina (g/dL)	5,29 ± 1,34 n=10	7,30 ± 3,22 n=10	2,53 ± 1,33 *** n=11
Ureia excretada 24 horas (mg)	490,36 ± 161,55 n=10	475,97 ± 120,09 n=10	725,47 ± 257,48 ** n=10
Creatinina urina (mg/dL)	119,35 ± 36,71 n=10	130,67 ± 33,54 n=10	43,64 ± 10,96 *** n=11
Depuração creatinina (mL/min)	1,60 ± 0,42 n=10	1,33 ± 0,48 n=10	0,80 ± 0,16 ** n=11
Água ingerida (mL/24 horas)	35,50 ± 6,85 n=10	32,50 ± 6,34 n=10	61,81 ± 14,01 *** n=11
Volume de urina (mL/24 horas)	10,30 ± 5,20 n=10	8,15 ± 3,06 n=10	34,81 ± 10,02 *** n=11
Proteinúria (mg/24 horas)	97,29 ± 26,34 n=10	88,32 ± 24,86 n=10	279,47 ± 115,68 *** n=11
Peso relativo rim x100	0,39 ± 0,07 n=10	0,45 ± 0,05 n=10	0,79 ± 0,22 ** n=11

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

5.2.1 Rins

A análise histológica do córtex renal demonstrou o efeito dos 5/6 de nefrectomia após um período crônico experimental de 12 semanas. A avaliação do córtex renal dos animais DRC evidenciou lesão renal acentuada com

diminuição significativa da contagem de glomérulos, comparando com os grupos Controle e Sham ($p<0,05$) (Figura 5.1), indicando hipertrofia tecidual. Além da expansão intersticial, foram observados no grupo DRC atrofia tubular, infiltrados inflamatórios, fibroses intersticial e glomerular, além de glomeruloesclerose (Figura 5.2).

Figura 5.1 - A, B e C - Fotomicrografias representativas do córtex renal dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. Grupo DRC demonstrou diminuição significativa da contagem de glomérulos comparando com os grupos Controle e Sham ($p>0.05$). D - Avaliação glomerular foi representada pela média $\pm$ erro padrão. $*p<0,05$, ($n=3$). Ampliação original x200, Barra=100 μ m, G=Glomérulos.

Figura 5.2 - A, B e C - Fotomicrografias do córtex renal coradas com hematoxilina e eosina (HE) representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. No grupo DRC (C) nota-se expansão intersticial e glomerular, as setas indicam os infiltrados inflamatórios. D, E e F - Fotomicrografias do córtex renal coradas com tricômico de Mallory (TM) representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. No grupo DRC (F), as cabeças de seta indicam as áreas de fibrose intersticial. G, H e I - Fotomicrografias do córtex renal coradas com ácido periódico de Schiff (Chatrchyan; Khachatryan) representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. No grupo DRC (I) nota-se expansão glomerular, atrofia tubular e espessamento da membrana basal das alças capilares glomerulares. Ampliação original x200, Barra= 100 µm, G= Glomérulo

5.2.2 Glândulas salivares

A avaliação histológica das glândulas salivares 12 semanas pós nefrectomia demonstrou na análise de contagens de ductos em campos x400, um aumento significativo na glândula submandibular no grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,01$) e ausência de alterações significativas na glândula parótida (Figura 5.3). As figuras 5.4 e 5.5 expõe fotomicrografias representativas das glândulas parótidas e submandibulares respectivamente, coradas com hematoxilina e eosina (HE),

tricômico de Mallory (TM) e ácido periódico de Schiff (Chatrchyan; Khachatryan). Não foram observadas alterações histológicas entre os grupos na glândula parótida; porém na glândula submandibular fica evidente no grupo DRC a aproximação dos ductos granulosos, sugestivo de atrofia dos ácinos (figura 5.5C e F), ausência de fibrose no parênquima glandular (Figura 5.5F) e na coloração PAS, observou-se menor intensidade de coloração no grupo DRC, sugestiva de diminuição quantitativa de glicogênio.

Figura 5.3 - A, B e C - Fotomicrografias representativas da glândula parótida coradas com HE dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. D, E e F - Fotomicrografias representativas da glândula submandibular coradas com HE dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. Grupo DRC (F) demonstrou aumento significativo da contagem de ductos (setas) comparando com os grupos Controle e Sham. D e G - Avaliação dos ductos das glândulas parótida e submandibulares respectivamente, foi representada pela média $\pm$ erro padrão, (n=3). **p<0,01. Barra= 50 μ m

Figura 5.4 - A, B e C - Fotomicrografias representativas do parênquima da glândula parótida coradas com hematoxilina e eosina (HE) dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. As setas são indicativas dos septos interlobulares. D, E e F - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC coradas com tricômico de Mallory (TM), respectivamente. As setas são indicativas dos septos interlobulares. G, H e I - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, corados com ácido periódico de Schiff, respectivamente. Ampliação original X200 e x400, Barra = 100 µm e 50 µm. DS = ducto estriado, DE = ducto excretor

Figura 5.5 - A, B e C - Fotomicrografias representativas do parênquima da glândula submandibular coradas com hematoxilina e eosina (HE) dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente. D, E e F - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente, coradas com tricômico de Mallory (TM),. G, H e I - Fotomicrografias representativas dos grupos Controle, Sham e DRC, respectivamente, corados com ácido periódico de Schiff (Chatrchyan; Khachatryan). Nota-se no grupo DRC (I) menor intensidade de coloração nos ácinos. Ampliação original X200 e x1000, Barra = 100 µm. DG=ducto granuloso, DE= ducto excretor

5.3 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

5.3.1 Amilase, Peroxidase e Catalase

A figura 5.6 exibe as médias e erros padrões das atividades enzimáticas da Amilase das glândulas parótidas (5.6A) e submandibulares (5.6B) dos grupos Controle, Sham e DRC. Observou-se ausência de alterações significativas em ambas as glândulas.

Em relação à atividade enzimática da peroxidase, foi observado aumento significativo na glândula parótida do grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham ($p<0,01$). Na glândula submandibular não foram observadas alterações significativas entre os grupos experimentais (Figura 5.6C).

A figura 5.6D exibe o aumento significativo da atividade enzimática da Catalase na glândula parótida do grupo DRC comparando com os grupos Controle ($p<0,01$) e Sham ($p<0,05$). Observa-se também a ausência de alterações significativas entre os grupos na glândula submandibular.

Em relação às concentrações de proteínas totais, observou-se aumento significativo na glândula submandibular do grupo DRC comparando com o grupo Controle ($p<0,05$).

Figura 5.6 - A - Atividade enzimática da Amilase da glândula parótida; B- Atividade enzimática da Amilase da glândula submandibular; C- Atividades enzimáticas da Peroxidase das glândulas parótidas e submandibulares; D - Atividades enzimáticas da Catalase das glândulas parótidas e submandibulares; E - Concentrações de proteínas totais das glândulas parótidas e submandibulares. Análises realizadas nos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, $n = 10$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$

5.3.2 Enzimas- Metabolismo da glicose

A figura 5.7 exibe os resultados das atividades enzimáticas da hexoquinase (HK (A), fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) (B), piruvato quinase (PK) (C), lactato desidrogenase (LDH) (D), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) (E) e das concentrações de proteínas totais (F), nas glândulas parótidas e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC. As alterações estatisticamente significantes foram: diminuições significativas das atividades enzimáticas da PFK-1 nas glândulas parótida e submandibular do grupo DRC comparando com o grupo Controle ($p < 0,05$); diminuição significativa da atividade enzimática da LDH na glândula parótida do grupo DRC comparando com o grupo Controle ($p < 0,05$). Em relação às concentrações de proteínas totais, observou-se aumento significativo da glândula parótida do grupo DRC comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$) e diminuição significativa na glândula submandibular do grupo DRC comparando com o grupo Controle ($p < 0,05$).

Figura 5.7 - Atividade enzimática da hexoquinase (HK; B - Atividade enzimática da fosfofrutoquinase-1 (PFK-1); C - Atividade enzimática da piruvato quinase (PK) das; D - Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH); E - Atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD); F - Concentrações de proteínas totais das glândulas parótidas e submandibulares. Análises realizadas nas glândulas parótida e submandibular dos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, $n = 10$. * $p < 0,05$

5.4 ANÁLISE METABÓLICA POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

5.4.1 Resultados com infusão de [U-¹³C]Glicose

A figura 5.8 apresenta os resultados dispostos como médias e erros padrões das concentrações de metabólitos das glândulas parótidas e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC. Estas concentrações foram mensuradas a partir da análise espectral ¹H RMN dos extratos perclóricos das glândulas salivares. A figura 5.9 exhibe expansões representativas dos espectros ¹H RMN dos extratos das glândulas parótidas dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso (A-C) e estimulados (D-F) e das glândulas submandibulares em repouso (G-I) e estimulados (J-L).

Em relação às concentrações de ¹²C-Lactato, o estímulo promoveu aumentos significativos em todos os grupos experimentais na glândula parótida ($p < 0,01$). Na glândula submandibular o mesmo estímulo gerou aumentos significativos nos grupos Controle ($p < 0,01$), Sham e DRC ($p < 0,05$) (Figura 5.8A).

Em relação à concentração de ¹²C-Alanina, foi observada diminuição significativa na glândula parótida do grupo DRC em repouso comparando com os grupos Controle ($p < 0,05$) e Sham ($p < 0,01$). O estímulo suscitou um aumento significativo da concentração deste metabólito ($p < 0,05$) (Figura 5.8B).

Observando as concentrações de ¹²C-Acetato, notam-se aumentos significativos no grupo DRC estimulado comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,05$) na glândula parótida. Na glândula submandibular notou-se aumento significativo no grupo DRC comparado ao grupo Sham ($p < 0,05$), ambos sob a mesma condição de estímulo (Figura 5.8D).

Em relação as concentração de ¹²C-Creatina, notamos diminuição significativa na glândula parótida do grupo DRC em repouso comparando com os demais grupos experimentais ($p < 0,05$). Observando o efeito do estímulo neste grupo, nota-se um aumento significativo da concentração deste metabólito ($p < 0,01$). No caso da glândula submandibular observamos

diminuição significativa no grupo DRC comparando com o grupo Sham ($p < 0,05$) (Figura 5.8E).

Figura 5.8 - Concentrações de ^{12}C -Lactato (A), ^{12}C -Alanina (B), $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ (C), ^{12}C -Acetato (D) e ^{12}C -Creatina (E), das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, $n = 6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Figura 5.9 - Expansões representativas das regiões metílicas dos espectros ^1H RMN dos extratos das glândulas parótidas dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso (KatchiburianArana-Chavez) e estimulados (D-F) e das glândulas submandibulares em repouso (G-I) e estimulados (J-L). Lac = Lactato, Ala = Alanina, Ace = Acetato, Suc = Succinato e Cre = Creatina.

A figura 5.10 expõe os resultados das razões entre metabólitos provenientes das análises ^1H e ^{13}C RMN e também análise de isotopômeros aos níveis do Lactato e Glutamato. A figura 5.11 exhibe expansões de espectros ^{13}C RMN representativos das regiões C3-Lactato em repouso (A), C2-Lactato em repouso (B), C3-Lactato com estímulo (C) e C2- Lactato com estímulo (D).

Nota-se na análise da relação ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina, indicador do redox citosólico, que o estímulo gerou na glândula parótida aumentos significativos nos grupos Controle e Sham ($p < 0,001$). No grupo DRC, nota-se aumento significativo na condição de repouso comparando com os demais grupos ($p < 0,05$). Na glândula submandibular notam-se aumentos significativos nos grupos Controle ($p < 0,001$), Sham e DRC ($p < 0,05$) pós-estimulação (Figura 5.10A).

A razão ^{13}C 3-Lactato/ ^{13}C 3-Alanina na glândula parótida mostrou aumento significativo pós-estímulo no grupo Controle ($p < 0,05$). Na glândula submandibular, o estímulo determinou aumentos significativos nos grupos Controle e Sham ($p < 0,001$) (Figura 5.10B).

Não foram observadas alterações significativas em ambas as glândulas nas análises da porcentagem de $[2,3^{13}\text{C}_2]\text{Lactato}$, indicativo da atividade anaplerótica, e da relação entre ^{13}C 3 Lactato e ^{13}C 4 Glutamato, alusivo ao acoplamento entre a glicólise e do ciclo de Krebs. Já observando os resultados da relação entre ^{13}C 3 e ^{13}C 4 Glutamato, notamos alteração significativa com diminuição significativa na glândula parótida do grupo DRC pós-estímulo (Figuras 5.10 C, D e E).

Figura 5.10 - Razões de $^{12}\text{C-Lactato}/^{12}\text{C-Alanina}$ (A), $^{13}\text{C-Lactato}/^{13}\text{C-Alanina}$ (B), % $[2,3-^{13}\text{C}_2]\text{-Lactato}$ (C), $^{13}\text{C-Lactato}/^{13}\text{C}_4\text{-Glutamato}$ (D) e $^{13}\text{C}_3\text{-}/^{13}\text{C}_4\text{-Glutamato}$ das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, $n = 6$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Figura 5.11 - Expansões de espectros ^{13}C RMN representativos das regiões C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato em repouso (A), C2-Lactato em repouso (B), C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato com estímulo (C) e C2-Lactato com estímulo (D). Na região C2-Lactato podemos distinguir as diferentes populações de isotopômeros: $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ - Quarteto (Q), $[\text{2,3-}^{13}\text{C}_2]\text{Lactato}$ - Doblete 2,3 (D_{23}), $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2]\text{Lactato}$ - Doblete 1,2 (D_{12}) e $[\text{2-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ - Singleto (S)

5.4.1.1 Análise do glicogênio na glândula submandibular por RMN

A extração e análise do conteúdo de glicogênio por RMN nas glândulas em repouso e com estímulo da salivação só foram eficazes na glândula submandibular, possivelmente devido ao menor conteúdo lipídico do seu estroma, que possibilitou a ação enzimática da aminoglicosidase e a observação dos picos de glicose nos espectros ^1H RMN (Ver seção 4.8.2). Dessa forma, a figura 5.12 exibe as concentrações de glicose calculadas a

partir da análise espectral ^1H RMN dos extratos das glândulas submandibulares em repouso e com estímulo dos grupos Controle, Sham e DRC. Podemos observar que o estímulo promoveu diminuições deste conteúdo em todos os grupos experimentais, sendo estatisticamente significativo no grupo DRC ($p < 0,05$).

Figura 5.12 - Concentrações de glicose da glândula submandibular dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e estimulados. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, $n=3$. * $p < 0,05$

5.4.2 Resultados com infusão de $[1,6-^{13}\text{C}_2]\text{Glicose}$, $[2-^{13}\text{C}]\text{Glicose}$ e $[U-^{13}\text{C}]\text{Ácidos graxos}$

A figura 5.13 apresenta as médias e erros padrões das concentrações de metabólitos, medidos a partir da análise espectral ^1H RMN dos extratos perclóricos das glândulas parótida e submandibular.

A figura 5.14 exhibe expansões representativas dos espectros ^1H RMN dos extratos das glândulas parótidas dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso (A-C) e estimulados (D-F) e das glândulas submandibulares em repouso (G-I) e estimulados (J-L).

Em relação às concentrações de ^{12}C -Lactato, o estímulo promoveu aumentos significativos na glândula parótida, no grupo controle ($p < 0,05$), Sham

e DRC ($p < 0,01$). Na glândula submandibular o mesmo estímulo gerou aumentos significativos nos grupos Controle ($p < 0,001$), Sham ($P < 0,01$) e DRC ($p < 0,05$) (Figura 13A). Já em relação às concentrações de ^{13}C -Lactato, o estímulo foi capaz de gerar aumentos significativos nos grupos Controles de ambas as glândulas ($p < 0,05$) (Figura 5.13B).

Na análise da concentração de ^{12}C -Acetato, observamos aumento significativo na glândula submandibular do grupo DRC estimulado, comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,05$). Além disso, nota-se aumento significativo de ^{13}C -Acetato na glândula parótida em repouso comparando com o grupo controle ($p < 0,05$), mostrando acúmulo deste metabólito em ambos os tecidos estudados (Figuras 5.13 D e E).

Em relação às concentrações de ^{12}C -Succinato, o estímulo da salivação gerou aumentos significativos na glândula submandibular dos grupos Controle e DRC ($P < 0,05$) (Figura 5.13F). A análise de ^{12}C -Creatina demonstrou diminuição significativa na glândula parótida em repouso do grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,05$) (Figura 5.13G).

A análise das concentrações de ^{12}C -Glicose, mostrou diminuições em ambas as glândulas do grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham. Esta diminuição foi estatisticamente significativa na glândula parótida do grupo DRC em repouso, comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,05$) (Figura 5.13H).

Figura 5.13 - Concentrações de ^{12}C -Lactato (A), ^{13}C -Lactato (B), ^{12}C -Alanina (C), ^{12}C -Acetato (D), ^{13}C -Acetato (E), ^{12}C -Succinato (F), ^{12}C -Creatina (G) e ^{12}C -Glicose (H), das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como Média $\pm$ erro padrão, n=6. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

Figura 5.14 - Expansões representativas das regiões metílicas dos espectros ^1H RMN dos extratos das glândulas parótidas dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso (KatchiburianArana-Chavez) e estimulados (D-F) e das glândulas submandibulares em repouso (G-I) e estimulados (J-L). Lac=Lactato, Ala=Alanina, Ace=Acetato, Suc= Succinato, Cre= Creatina e Glu=Glicose

A figura 5.15 exibe os resultados das razões entre metabólitos provenientes das análises ^1H e ^{13}C RMN. A figura 16 exibe expansões de espectros ^{13}C RMN representativos das regiões C3-Lactato em repouso (A), C2-Lactato em repouso (B), C3-Lactato com estímulo (C) e C2-Lactato com estímulo (D).

Em relação à razão ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina, podemos observar que na glândula parótida o estímulo foi capaz de gerar aumentos significativos nos grupos Controle e Sham ($p < 0,05$). Na glândula submandibular o mesmo estímulo gerou aumentos significativos nos grupos Controle ($p < 0,001$) e Sham ($p < 0,01$). Em ambas as glândulas o estímulo não gerou aumentos significativos no grupo DRC (Figura 5.15A).

A análise da razão ^{13}C 3-Lactato/ ^{13}C 3-Alanina da mesma forma que a razão anterior, demonstra que o estímulo gerou aumentos significativos em ambas as glândulas analisadas. Na parótida, observamos aumentos significativos nos grupos Controle e Sham ($p < 0,05$), além disso, no grupo DRC estimulado a razão foi significativamente inferior em relação ao grupo Sham ($p < 0,05$). Na glândula submandibular os aumentos foram significantes nos grupos Controle e Sham ($p < 0,01$) (Figura 5.15B).

A relação ^{13}C 3-Lactato/ ^{13}C 3-Acetato demonstrou diminuição significativa na glândula submandibular do grupo DRC estimulado comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,05$) (Figura 5.15C). Nenhuma alteração significativa foi observada na análise da razão ^{13}C 3-/ ^{13}C 4-Glutamato.

Na observação espectral do carbono na posição 4 do glutamato (34,2 ppm) notamos a presença de um singuleto ($[4-^{13}\text{C}]$ Glutamato), com ausência de marcação na posição 5. Esta marcação indica que nas condições experimentais executadas, existe prevalência da contribuição de Acetil-CoA oriunda do fluxo glicolítico em relação à da β -oxidação.

Figura 5.15 - Razões de ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina (A), $^{13}\text{C}_3$ -Lactato/ $^{13}\text{C}_3$ -Alanina (B), $^{13}\text{C}_3$ -Lactato/ $^{13}\text{C}_3$ -Acetato (C) e $^{13}\text{C}_3$ -/ $^{13}\text{C}_4$ -Glutamato das glândulas parótida e submandibulares dos grupos Controle, Sham e DRC em repouso e sob estímulo da salivação. Os resultados estão expressos como (D). Média $\pm$ erro padrão, $n=6$. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$

Figura 5.16 - Expansões de espectros ^{13}C RMN representativos das regiões C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato em repouso (A), C2-Lactato em repouso (B), C3-Lactato, C3-Alanina e C3-Acetato com estímulo (C) e C2-Lactato com estímulo (D)

5.5 CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO

Os resultados das concentrações de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica, demonstraram aumentos significativos no grupo DRC. No caso da glândula parótida o aumento foi significativo comparando aos grupos Controle e Sham ($p < 0,01$) e na submandibular, o aumento no grupo DRC foi significativo comparado ao grupo Sham ($p < 0,05$) (Figura 5.17).

Figura 5.17 - Concentrações de malondialdeído da glândula parótida (A) e glândula submandibular (B) nos grupos Controle, Sham e DRC. Média $\pm$ erro padrão, $8 < n < 10$. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.6 CONCENTRAÇÕES DE GLICOGÊNIO GLANDULAR

A figura 5.18 expõe os resultados das quantificações de glicogênio das glândulas parótida e submandibular. Na glândula parótida não foram encontradas alterações significativas entre os grupos experimentais; na glândula submandibular foi encontrada diminuição significativa no grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham ($p < 0,01$).

Figura 5.18 - Concentrações de glicogênio da glândula parótida (A) e glândula submandibular (B) nos grupos Controle, Sham e DRC. Média $\pm$ erro padrão, n=10. ** p<0,01

5.7 CONCENTRAÇÕES IÔNICAS

Os resultados das análises iônicas das glândulas parótida e submandibular estão expostos nas tabelas 5.2 e 5.3, respectivamente.

Na glândula parótida não foram encontradas alterações significativas entre os grupos experimentais das concentrações teciduais de cálcio, fósforo e sódio. Na glândula submandibular foi observado aumento significativo da concentração tecidual de sódio no grupo Sham comparando com o grupo Controle (p<0,05) e também no grupo DRC comparando com os grupos Controle e Sham (p<0,01).

Tabela 5.2 - Concentrações iônicas da glândula parótida dos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. n= número de animais por grupo

	Controle	Sham	DRC
Cálcio (PPM/mg de tecido)	0,19 $\pm$ 0,02 n=9	0,20 $\pm$ 0,03 n=7	0,20 $\pm$ 0,02 n=8
Fósforo (PPM/mg de tecido)	0,20 $\pm$ 0,03 n=9	0,24 $\pm$ 0,05 n=7	0,23 $\pm$ 0,02 n=8
Sódio (PPM/mg de tecido)	0,14 $\pm$ 0,01 n=9	0,15 $\pm$ 0,02 n=7	0,16 $\pm$ 0,01 n=8

Tabela 5.3 - Concentrações iônicas da glândula submandibular dos grupos Controle, Sham e DRC. Os resultados estão expressos como média $\pm$ DP. n= número de animais por grupo. # = $p<0,05$ comparando com o grupo Controle; ** $p<0,01$ comparando com os grupos Controle e Sham

	Controle	Sham	DRC
Cálcio (PPM/mg de tecido)	0,12 $\pm$ 0,03 n=10	0,13 $\pm$ 0,02 n=9	0,14 $\pm$ 0,03 n=10
Fósforo (PPM/mg de tecido)	0,17 $\pm$ 0,06 n=9	0,17 $\pm$ 0,06 n=9	0,15 $\pm$ 0,04 n=10
Sódio (PPM/mg de tecido)	0,07 $\pm$ 0,01 n=9	0,09 $\pm$ 0,01# n=9	0,11 $\pm$ 0,01 ** n=8

6 DISCUSSÃO

As glândulas salivares são órgãos exócrinos responsáveis pela produção e secreção salivar através de processos complexos. A saliva secretada, graças a sua composição, exerce múltiplas funções que contribuem para a manutenção da saúde oral (Pedersen et al., 2002). Sabemos que muitos são os fatores que contribuem para alterações de fluxo e composição salivar, dentre eles as alterações sistêmicas como a doença renal crônica, contudo, pouco se sabe a respeito dos efeitos da DRC nas glândulas salivares, sendo este o foco deste trabalho.

Este trabalho teve como objetivo analisar o efeito da nefropatia crônica experimental induzida por 5/6 de nefrectomia, no tempo experimental de doze semanas, nas glândulas salivares parótida e submandibulares de ratos.

O modelo experimental utilizado foi os 5/6 de nefrectomia, amplamente relatado na literatura. Quando a massa renal é reduzida, os néfrons remanescentes sofrem hipertrofias funcionais e estruturais. Adaptações na microcirculação dos glomérulos remanescentes resultam no aumento significativo da taxa de filtração (Deen et al., 1974). Esta hipertrofia funcional é geralmente considerada benéfica, no sentido que minimiza a redução da filtração glomerular total que poderia ocorrer. No entanto, diversos estudos têm demonstrado que o processo patológico de esclerose eventualmente ocorre nos glomérulos residuais (Brenner, 1985; Purkerson et al., 1976).

No presente trabalho, na análise de cortes histológicos nas regiões corticais renais, corados com ácido periódico de Schiff e tricômico de Mallory, foram identificados glomeruloesclerose e fibrose intersticial respectivamente, em decorrência dos 5/6 de nefrectomia. A glomeruloesclerose é caracterizada pelo dano e disfunção endotelial glomerular, proliferação das células mesangiais e injúria aos podócitos com excessiva deposição de matriz extracelular. A fibrose intersticial está intimamente associada ao comprometimento da função renal. Assim como na glomeruloesclerose, a patogênese da fibrose intersticial envolve a lesão tubular, principalmente devido à tentativa de reabsorção do excesso de proteínas filtradas, gerando liberação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento com recrutamento

de monócitos, macrófagos e posteriormente linfócitos. Posteriormente podemos notar atrofia tubular, transformação epitelial e mesenquimal com ativação e proliferação de fibroblastos e excessiva deposição de matriz extracelular gerando a fibrose (El-Nahas, 2003).

Além da análise histológica, as análises séricas e decorrentes da utilização da gaiola metabólica também caracterizam as alterações encontradas no grupo DRC. Em relação aos pesos dos animais, podemos observar que ao final do período experimental de doze semanas, ocorreu diminuição significativa no grupo Sham comparado ao grupo Controle, mostrando que o estresse cirúrgico afetou o desenvolvimento dos animais. Além disso, os animais do grupo DRC também apresentaram pesos corpóreos inferiores aos grupos Sham e Controle, evidenciando o efeito da doença no desenvolvimento corpóreo dos animais.

A deficiência no desenvolvimento é frequentemente relatada em crianças com DRC; é causada geralmente pelo mau funcionamento do eixo do hormônio de crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) nestes pacientes. O GH é o principal promotor do crescimento em crianças e exerce ações anabolizantes, mesmo em adultos, tais como aumento da síntese de proteínas, redução da degradação de proteínas, aumento da mobilização de gordura, aumento da gluconeogênese, sendo o IGF-1 o principal mediador destas ações (Feldt-Rasmussen; El Nahas, 2009). Estudos com ratos nefrectomizados mostraram o impacto da administração de GH nos marcadores de diferenciação dos condrócitos de discos epifisários desses animais. De maneira geral, a administração exógena do hormônio de crescimento aumenta a espessura dos discos epifisários, tendo uma ação benéfica na maturação e aumento da proliferação dos condrócitos (Barbosa et al., 2007; Metzger et al., 1993). Estudos clínicos em crianças relataram que a administração do GH promoveu desenvolvimento em altura e ganho de peso (Mehls et al., 2008); em adultos, promoveu aumento de albumina sérica, ganho de peso e melhoria na qualidade de vida (Feldt-Rasmussen et al., 2007).

Análises séricas exibiram aumentos significativos das concentrações de ureia e creatinina no grupo DRC, indicando retenção destes compostos no organismo dos animais em decorrência à diminuição da função renal. A

diminuição da função renal foi confirmada pela diminuição do *clearance* de creatinina (aproximadamente 50% comparando ao grupo controle).

A ureia é a forma da excreção do excesso de nitrogênio proveniente do metabolismo dos aminoácidos pelos vertebrados terrestres; é sintetizada no fígado por enzimas do ciclo da ureia, secretada para a corrente sanguínea e filtrada e excretada pelos rins. A creatinina é um catabólito do metabolismo muscular da creatina. A creatinina é formada em grande parte no músculo, a partir da fosfocreatina, por desidratação numa reação irreversível e não enzimática (Voet et al., 2000). A creatinina plasmática e urinária é representativa da massa muscular global de um indivíduo. Ao nível do néfron sofre um processo de filtração glomerular e considera-se que não é reabsorvida nem secretada ao nível tubular. Sendo a eliminação da creatinina endógena um parâmetro constante, a sua depuração serve como medida da taxa de filtração glomerular; existe na clínica uma correlação suficientemente válida entre a depuração e a concentração de creatinina no soro, sendo este parâmetro largamente utilizado para deduzir o grau de insuficiência glomerular (Guyton, 1997; Marzzoco; Torres, 1999).

Outro ponto importante foi o desenvolvimento de poliúria e polidipsia nos animais do grupo DRC. As capacidades de produzir urina concentrada (conservar água) e de excretar uma carga hídrica estão prejudicadas na DRC; a poliúria indica este defeito com polidipsia compensatória. O aumento da carga de solutos por cada néfron funcional residual é o principal fator que contribui para o defeito da concentração, ou seja, os néfrons residuais funcionam sob condições de diurese osmótica (Brenner, 1985).

Falando sobre os efeitos da DRC nas glândulas salivares, a avaliação histológica da glândula parótida do grupo DRC não apresentou fibrose (coloração tricômico de Mallory) ou qualquer aparente alteração de glicogênio tecidual. Na glândula submandibular, foi observado aumento da contagem de ductos em campos x200 de aumento no grupo DRC, indicativo de atrofia dos ácinos. Além disso, não foi observado fibrose no parênquima desta glândula no grupo DRC. Outra alteração observada foi a menor intensidade na coloração PAS, indicativo de menor quantidade de glicogênio, fato que se comprovou na quantificação bioquímica do glicogênio tecidual. Um relato de avaliação histológica na DRC avaliou glândulas salivares labiais de 17 pacientes

submetidos à hemodiálise, observaram-se alterações significativas em 41% dos pacientes apresentando atrofia e fibrose (Postorino; Catalano, 2003). Outro estudo encontrou deposição de fibrilas tipo amiloide através da microscopia eletrônica em glândulas labiais de pacientes com DRC não submetidos à hemodiálise (Kinashi et al., 1989).

Alguns sintomas estão relacionados a disfunções em glândulas exócrinas de pacientes em hemodiálise. Alterações da mucosa gástrica associada à deposição amiloide e também fibrose intersticial e periductal pancreática associada à secreção péptica severamente prejudicada, foram relatados nestes pacientes (Avram, 1977; Takahashi et al., 1988). Mais estudos são necessários para compreender o mecanismo responsável para a aparente atrofia na glândula submandibular, além disso, a avaliação da deposição de tecido amiloide se faz necessário.

A α -amilase é a enzima mais característica da saliva; é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo α -1,4 de polissacarídeos como o amido e possui outras funções como auxiliar a formação da película adquirida e adesão de microrganismos na superfície dentária (Al-Hashimi; Levine, 1989; Schenkels et al., 1995). Nossos resultados demonstraram atividade da amilase bastante superior na glândula parótida (~750 vezes) em relação à glândula submandibular, porém não encontramos alterações relacionadas à DRC. Estudos demonstram que a hiperamilasemia é um achado comum em pacientes com falência renal crônica. Estes estudos relataram aumentos das concentrações séricas, pancreáticas, salivares e diminuição urinária da amilase em pacientes com graus variados de doença renal crônica e também nos submetidos à hemodiálise em relação ao grupo controle; em um dos estudos, o grupo transplantado deixou de apresentar estas alterações (Dardamanis et al., 1995; Tsianos et al., 1994). Outro estudo observou aumento significativo do conteúdo de amilase no grupo em falência renal crônica em relação ao grupo controle, porém não foi encontrada alteração significativa no grupo com estágio intermediário da doença, mostrando que não existe um consenso sobre o conteúdo de amilase nos estágios intermediários da DRC (Tomas et al., 2008). Dessa forma, uma possível explicação para a ausência de alterações na atividade da amilase nos animais do grupo DRC, seria que os mesmos não teriam alcançado grau suficiente de doença para

ocorrer tal alteração. Outra possibilidade seria a quantificação do total de amilase nos tecidos, não apenas a atividade enzimática.

Outras atividades enzimáticas avaliadas foram da peroxidase e catalase. Os resultados demonstraram aumentos significativos destas atividades enzimáticas na glândula parótida do grupo DRC, comparando aos grupos Controle e Sham. Estas alterações juntamente com os aumentos encontrados das concentrações de MDA, marcador de peroxidação lipídica, nas glândulas parótidas e submandibulares nos animais do grupo DRC indicam a presença de estresse oxidativo nas glândulas salivares nesta condição experimental.

A catalase está presente nos peroxissomos. Como parte do sistema antioxidante enzimático, possui a função auxiliar à glutathione peroxidase (GPx) na degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em situações patológicas com o aumento dos radicais livres, a catalase desempenha papel crucial pela menor afinidade com o H_2O_2 que a GPx (Nguyen-Khoa et al., 2001). A peroxidase é uma enzima com propriedades antimicrobianas, catalisa a oxidação de tiocianato (SCN^-) na presença de H_2O_2 , produzindo hipotiocianato ($OSCN^-$), o qual inibe o crescimento bacteriano por oxidar compostos presentes nas paredes celulares, além de evitar o acúmulo de H_2O_2 , substância tóxica atuando como enzima antioxidante (Ashby, 2008).

Diversos estudos avaliaram o estresse oxidativo na DRC. Toxinas decorrentes da uremia, por exemplo, o acúmulo de ácido úrico pode ser fonte de estresse oxidativo nos pacientes com DRC. A síntese de ácido úrico também pode promover estresse oxidativo diretamente através da atividade da xantina oxidoreductase. A enzima perde a sua capacidade de se ligar ao NADH por alterações no seu sítio catalítico e, em vez disso, transfere elétrons para o O_2 , gerando assim O_2^- . Além disso, a retenção de toxinas urêmicas promove a inflamação, primeiramente com recrutamento de células polimorfonucleadas, ativação de IL-1 e IL-8 e estimulando a resposta imune inata (Small et al., 2012).

Como os radicais livres possuem tempos de meia vida extremamente curtos, a mensuração do estresse oxidativo pode ser realizada medindo produtos finais específicos do processo. Biomarcadores de peroxidação lipídica como isoprostanos e o MDA têm sido utilizados como medida de estresse

oxidativo sistêmico e não apenas no rim (Dounousi et al., 2006; Nath et al., 1990). Além disso, a análise do sistema antioxidante total e enzimático em amostras de sangue, urina, tecidos e cultura, de pacientes em diversos graus de DRC, submetidos à hemodiálise e de animais com nefropatia experimental encontraram alterações significativas indicativas de estresse oxidativo (Javanbakht et al., 2014; Stepniewska et al., 2016).

A produção e secreção de saliva pelas glândulas salivares são dependentes de energia e substratos para biossíntese, porém poucos relatos na literatura abordam o metabolismo das glândulas salivares. Neste trabalho foi empregada uma metodologia robusta na análise metabólica, utilizando a análise de isotopômeros de carbono 13 (^{13}C) por ressonância magnética nuclear (RMN) acoplada à administração de duas infusões de marcadores ^{13}C . Esta metodologia permite analisar o metabolismo intermediário das glândulas parótida e submandibulares no modelo experimental de DRC, possibilitando uma aferição da prevalência de metabolismo glicolítico ou oxidativo e a sua interligação.

A análise de isotopômeros de ^{13}C de intermediários metabólicos presentes nos extratos perclóricos foi efetuada com recurso a espectros de ^1H e ^{13}C RMN. Diversos fluxos metabólicos podem ser analisados com esta metodologia, já que as marcações em ^{13}C dos intermediários metabólicos são intrinsecamente dependentes dos fluxos metabólicos que os originam.

A primeira infusão utilizou $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Glicose}$ como marcador metabólico e permitiu a análise da glicólise, ciclo de Krebs e o acoplamento destes fluxos, além da análise de uma via de anaplerose, o ciclo do piruvato.

O lactato formado diretamente da infusão da $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Glicose}$ é da mesma forma uniformemente marcado ($[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$) e é distinguível nos espectros ^1H e ^{13}C RMN. A análise e quantificação de isotopômeros ao nível do lactato permitiram identificar que o isotopômero $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ está presente em níveis significativos em repouso e também com estímulo. Com estímulo, o isotopômero não marcado ($^{12}\text{C}\text{-Lactato}$) aumenta significativamente em relação à situação não estimulada. Outra marcação, o $[2,3\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Lactato}$ observado na análise da posição 2 do lactato no espectro ^{13}C RMN e também no espectro ^1H , diretamente demonstra a influência do ciclo do piruvato, fluxo prevalente em tecidos biossintéticos. Este isotopômero de lactato apresentou contribuições

para a pool de lactato de aproximadamente 10%, sendo que o estímulo não alterou estes níveis de maneira significativa. Na glândula submandibular, o estímulo gerou uma tendência de diminuição desta porcentagem, sugerindo a diminuição da atividade do ciclo com o desvio dos esqueletos carbônicos para vias de biossíntese; nenhuma alteração foi notada na glândula parótida.

Estes achados são consistentes com um metabolismo glicolítico ativo em ambas as glândulas, mais pronunciado na glândula submandibular em repouso e uma robusta ativação deste fluxo com o estímulo, representado pelo aumento significativo dos níveis de ^{12}C - Lactato.

A análise dos níveis de glicogênio por RMN da glândula submandibular permitiu identificar que esta é uma importante fonte não marcada, já que observamos que o estímulo gerou diminuição das suas concentrações. A contribuição do glicogênio na via glicolítica das glândulas salivares já foi sugerida por outros autores (Ferreira; Nicolau, 1985; Nicolau; Ribeiro, 1992).

A análise dos espectros ^{13}C RMN permitiu ainda a análise do acoplamento entre a glicólise e o ciclo de Krebs através da mensuração da incorporação de ^{13}C ao nível do lactato ($^{13}\text{C3}$ -Lactato) e sua relação com a incorporação de ^{13}C ao nível do glutamato ($^{13}\text{C4}$ -Glutamato). Entende-se que ocorre um melhor acoplamento quanto menor for a razão $^{13}\text{C3}$ -Lactato/ $^{13}\text{C4}$ -Glutamato. A sua análise nas glândulas PA e SM demonstra valores consideravelmente altos em todos os grupos com tendência de aumento mediante a estimulação, denotando um pobre acoplamento entre estas vias com predominância da glicólise nas glândulas salivares.

Outra razão analisada foi $^{13}\text{C3}$ -Glutamato/ $^{13}\text{C4}$ -Glutamato. A incorporação de ^{13}C ao nível de C3 do glutamato pode ser por duas vias metabólicas distintas. A primeira seria com a incorporação da $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetil-CoA}$ ao ciclo de Krebs, a atividade do ciclo geraria em uma segunda volta a marcação ao nível de C3. Dessa forma, uma maior atividade do ciclo aumentaria esta razão. A outra possibilidade seria por um fluxo metabólico alternativo, que utiliza a enzima piruvato carboxilase, permitindo a entrada do $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Piruvato}$ e enriquecimento de C3 do glutamato. Dessa forma, o aumento da razão $^{13}\text{C3}$ -Glutamato/ $^{13}\text{C4}$ -Glutamato indicaria uma maior atividade do ciclo de Krebs e/ou do ciclo do piruvato, o que indicaria uma maior capacidade biossintética tecidual. Na glândula parótida do grupo DRC foi observado que o

estímulo gerou uma diminuição significativa desta razão, sugerindo uma diminuição da função do ciclo de Krebs, do ciclo do piruvato ou de ambos, ou ainda uma alteração considerável na preferência por substrato quando da estimulação, sendo esse substrato não enriquecido e contribuindo com Acetil-CoA não marcada. Uma fonte bastante plausível poderia consistir nos ácidos graxos de cadeia longa.

O segundo experimento com marcadores metabólicos em ^{13}C teve como objetivo avaliar a prevalência além da glicólise ($[1,6-^{13}\text{C}_2]\text{Glicose}$, a via das pentoses fosfato ($[2-^{13}\text{C}]\text{Glicose}$) e a contribuição dos ácidos graxos para o ciclos dos ácidos tricarboxílicos ($[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{ácidos graxos}$).

Na análise de isotopômeros ao nível do lactato a partir dos marcadores utilizados, sabemos que a metabolização da $[1,6-^{13}\text{C}_2]\text{Glicose}$ origina o $[3-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$; a metabolização da $[2-^{13}\text{C}]\text{Glicose}$ poderia seguir dois fluxos distintos: a glicólise originando o $[2-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$, ou a via das pentose fosfato, que daria origem aos isotopômeros $[3-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ e $[1,3-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$. Na análise espectral ^1H RMN dos satélites do lactato, a presença do isotopômero $[1,3-^{13}\text{C}]\text{Lactato}$ implicaria o aparecimento de um quarteto, fato que não ocorreu. Isso indica que dentro das condições experimentais adotadas, existe a prevalência do fluxo glicolítico e contribuição desprezível do fluxo da via das pentoses fosfato na metabolização da glicose.

Outro ponto importante deste experimento foi investigar a possível contribuição do metabolismo de ácidos graxos ao ciclo de Krebs nas glândulas salivares. A metabolização dos $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{Ácidos graxos}$ daria origem ao $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetil CoA}$ pós β -oxidação e, analisando os isotopômeros ao nível do C4 do glutamato, seria observada marcação nos carbonos 4 e 5 ($[4,5-^{13}\text{C}_2]\text{Glutamato}$). Na análise espectral ^{13}C RMN ao nível de C4 do glutamato observou-se apenas $[4-^{13}\text{C}]\text{Glutamato}$, indicativo da contribuição do fluxo glicolítico ($[1,6-^{13}\text{C}_2]\text{Glicose}$) e ausência de contribuição significativa dos ácidos graxos para a pool de Acetil-CoA. Desta forma, dentro das condições experimentais adotadas, podemos afirmar que a contribuição da β -oxidação foi diminuta no fluxo oxidativo. É importante aqui salientar que por se tratar de um experimento *in vivo* ocorreu diluição dos marcadores, bem como a utilização de fontes teciduais não marcadas. Estes fatos podem ter impossibilitado a

detecção na análise ^{13}C RMN, que possui a vantagem de ser bastante específica, porém a desvantagem da baixa sensibilidade.

Na glândula submandibular do grupo DRC o estímulo não gerou aumento significativo da razão ^{13}C -Lactato/ ^{13}C -Acetato, gerado pelo acúmulo de Acetil-CoA tecidual pela sua não utilização no ciclo de Krebs.

A razão entre os níveis de Lactato e Alanina fornece uma estimativa indireta do estado redox citosólico, relacionado com a razão $\text{NADH}(\text{H}^+)/\text{NAD}^+$. A estimativa do redox citosólico, mesmo que indiretamente, é fundamental já que em torno de 700 enzimas oxidoredutases estão envolvidas com processos bioquímicos celulares e utilizam NAD^+ ou $\text{NADH}(\text{H}^+)$ como cofatores (Sun et al., 2012).

A análise da razão ^{12}C -Lactato/ ^{12}C -Alanina utilizando ^1H RMN dos extratos glandulares demonstrou um aumento robusto pós-estimulação em ambas as glândulas e grupos, com exceção da glândula parótida do grupo DRC no primeiro estudo e em ambas as glândulas do grupo DRC no segundo estudo. Esta alteração denota incapacidade de manutenção dos níveis citosólicos de $\text{NADH}(\text{H}^+)$ e este dano no redox citosólico nas glândulas salivares na DRC é certamente multifatorial e necessita de outros estudos.

Níveis de outros metabólitos também foram analisados: alanina, acetato, creatina, succinato e glicose. Como os níveis destes metabólitos são consideravelmente menores em relação ao lactato, a análise de satélites ^{13}C não se tornou possível nos espectros ^1H RMN. As análises dos níveis ^{12}C destes metabólitos mostraram alterações significativas no grupo DRC. Os níveis de ^{12}C -Alanina e ^{12}C -Creatina se mostraram reduzidos em repouso na glândula parótida do grupo DRC e o estímulo suscitou o aumento destes níveis sem distinção aos demais grupos no primeiro estudo; no segundo estudo também observamos diminuição da concentração de creatina na glândula parótida do grupo DRC. Existe um equilíbrio entre a creatina nos tecidos e os níveis séricos de creatinina, e este equilíbrio é fortemente dependente do pH. A DRC é caracterizada pela acidose metabólica (Kraut; Madias, 2016), a qual induz a conversão da creatina em creatinina (Edgar; Wakefield, 1923), com uma consequente redução dos níveis de creatina em repouso. Nós sugerimos que com estímulo, ocorre a redução da acidose sistêmica e intracelular,

causando inversão do equilíbrio creatina-creatinina, com reposição dos níveis de creatina. Infelizmente medições de pH do plasma não foram realizadas.

Em relação à ^{12}C -Alanina, as reduções observadas no grupo DRC em repouso são consistentes com metabolismo menos ativo, comparado aos grupos Controle ou Sham. Na medida em que os equivalentes redutores não são tão consumidos em processos biossintéticos há uma maior utilização dos mesmos na conversão de piruvato a lactato com a ação da enzima lactato desidrogenase, e subsequente redução dos níveis de alanina teciduais por ação da alanina aminotransferase que interconverter piruvato e alanina.

Os níveis de ^{12}C -Acetato aumentaram significativamente no primeiro estudo (infusão com $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose) em ambas as glândulas do grupo DRC com o estímulo; no segundo estudo (infusão de mistura de marcadores) foram observados aumentos de ^{12}C -Acetato na glândula submandibular no grupo DRC com estímulo e aumento de ^{13}C -Acetato na glândula parótida do grupo DRC em repouso. Estes aumentos refletem maiores níveis de Acetil-CoA nos tecidos. Estes aumentos podem estar associados à inibição da oxidação do ciclo de Krebs, sugerindo que a estimulação glandular na DRC não foi capaz de melhorar o fluxo oxidativo do ciclo de Krebs, piorando o seu acoplamento com a glicólise.

Outra importante alteração observada foram diminuições dos níveis de ^{12}C -Glicose no grupo DRC, estatisticamente significante na glândula parótida e com tendência de significância na glândula submandibular. Estas diminuições podem estar correlacionadas à resistência à insulina desenvolvida na DRC. A resistência à insulina é prevalente em pacientes com DRC e contribui para a progressão da doença renal e com o elevado risco cardiovascular nesta condição. A etiologia da resistência à insulina nesta população é de natureza multifatorial e fatores de risco incluem inatividade física, inflamação e estresse oxidativo, alterações nas adipocinas, deficiência de vitamina D, acidose metabólica e anemia. Diversos estudos clínicos investigaram a prevalência da resistência à insulina na DRC (Spoto et al., 2016).

Estudos com modelos animais de DRC encontraram alteração na via que ativa a translocação do GLUT4 (transportador de glicose insulino dependente) e também redução da expressão do GLUT4 nos músculos (Aksentijevic et al., 2009; Bailey et al., 2006). Outro estudo com adipócitos de

rato estimulados com insulina e incubadas com soro de pacientes com DRC mostram uma absorção de glicose reduzida (McCaleb et al., 1984).

Nas análises iônicas encontramos aumento significativo da concentração de Na^+ na glândula submandibular no grupo DRC. Estudos clínicos encontraram aumentos significativos da concentração de Na^+ na saliva de pacientes com DRC em estágios intermediários e também submetidos à hemodiálise (Kopcansky et al., 2008; Martins et al., 2006). Para compreensão deste aumento, teremos que analisar o processo de secreção salivar e as trocas iônicas que ocorrem nos ductos, sendo todas bastante dependentes da $[\text{Na}^+]$.

As células acinares secretam a saliva primária com altas concentrações de Na^+ , Cl^- e baixa concentração de K^+ . Conforme o fluido salivar passa pelos ductos ocorrem trocas iônicas de Na^+ e Cl^- por K^+ e HCO_3^- e a saliva se torna hipotônica em relação ao plasma. A entrada de sódio nas células do ducto ocorre através do cotransportador sódio bicarbonato (NCB1) na membrana basolateral, pelo canal de sódio ENaC na membrana luminal e pelo trocador Na^+/H^+ , NHE4 na membrana basolateral e NHE3 na membrana luminal. O sódio deixa a célula através do cotransportador sódio bicarbonato na membrana luminal (NCB1) e via Na^+/K^+ ATPase (Patterson et al., 2012). O modelo predominante do transporte de eletrólitos nos ductos prevê que ocorre reabsorção de NaCl, não só mantendo a elétron neutralidade via trocadores Na^+/H^+ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, mas também via canais de Na^+ e Cl^- (Roussa, 2011). Uma possível explicação para os aumentos das concentrações salivares observadas nos estudos clínicos e para o aumento tecidual da $[\text{Na}^+]$, seria pela inibição dos canais de sódio ENaC, que possuem participação determinante para reabsorção de sódio nos ductos. Esta inibição, bem como outras alterações observadas na glândula salivar pode estar correlacionada à acidose metabólica; sabe-se que a acidificação intracelular inibe o α -ENaC (Bhalla; Hallows, 2008). Dessa forma, são necessários estudos dos efeitos da DRC na localização e expressão dos canais mencionados anteriormente, para melhor compreensão das alterações iônicas salivares.

7 CONCLUSÕES

Diante das condições experimentais e dos resultados obtidos é lícito concluir que:

- As alterações histológicas nos rins do grupo DRC são compatíveis com o estabelecimento da doença;
- A modificação estrutural é evidente somente na glândula submandibular do grupo DRC, mostrando diferentes sensibilidades das glândulas estudadas à doença;
- O dano oxidativo está presente nas glândulas salivares no modelo experimental proposto;
- O fluxo metabólico nas glândulas salivares é majoritariamente glicolítico, sendo o glicogênio uma importante fonte energética no processo durante a estimulação;
- Existe comprometimento da via glicolítica nas glândulas submandibulares e parótidas na DRC;
- Existe comprometimento do uso da glicose no processo oxidativo na DRC;
- A alteração da concentração de sódio na glândula submandibular é sugestiva do comprometimento do transporte iônico nesta glândula.

REFERÊNCIAS¹

K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266. doi:S0272638602093563 [pii]

Abrantes AM, Tavares LC, Pires S, et al. Metabolic effects of hypoxia in colorectal cancer by ¹³C NMR isotopomer analysis. *Biomed Res Int.* 2014;2014(759791). doi:10.1155/2014/759791.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105(2):121-6.

Aksentijevic D, Bhandari S, Seymour AM. Insulin resistance and altered glucose transporter 4 expression in experimental uremia. *Kidney Int.* 2009;75(7):711-718. doi:10.1038/ki.2008.691.

Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Arch Oral Biol.* 1989;34(4):289-95.

Alger JR, Sillerud LO, Behar KL, et al. In vivo carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of mammals. *Science.* 1981,nov;214(4521):660-2.

Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC. Salivary mucins: protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology.* 1995,Dec;5(8):733-740.

Anderson LC. Peroxidase release from rat submandibular salivary acinar cells in vitro. *Arch Oral Biol.* 1986;31(7):501-3.

Arnold JT, Packard ME. Variations in absolute chemical shift of nuclear induction signals of hydroxyl groups of methyl and ethyl alcohol. *Chemi Phys.* 1951;19(12):1608-9. doi:10.1063/1.1748134

Ashby MT. Inorganic chemistry of defensive peroxidases in the human oral cavity. *J Dent Res.* 2008,Oct;87(10):900-914.

Avram MM. High prevalence of pancreatic disease in chronic renal failure. *Nephron.* 1977;18(1):68-71.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bailey IA, Gadian DG, Matthews PM, et al. Studies of metabolism in the isolated, perfused rat heart using ^{13}C NMR. *FEBS Lett.* 1981,Jan;123(2):315-8.

Bailey JL, Zheng B, Hu Z, et al. Chronic kidney disease causes defects in signaling through the insulin receptor substrate/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: implications for muscle atrophy. *J Am Soc Nephrol.* 2006,May;17(5):1388-94. doi:10.1681/ASN.2004100842.

Barbosa AP, Silva JD, Fonseca EC, et al. Response of the growth plate of uremic rats to human growth hormone and corticosteroids. *Braz J Med Biol Res.* 2007,Aug;40(8):1101-09.

Bergamaschi CT, Boim MA, Moura LA, et al. Effects of long-term training on the progression of chronic renal failure in rats. *Med Sci Sports Exerc.* 1997,Feb;29(2):169-74.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000,Feb;49(2 Suppl 1):3-8.

Bhalla V, Hallows KR. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol.* 2008,Oct;19(10):1845-54. doi:10.1681/ASN.2008020225.

Bots CP, Brand HS, Poorterman JH, et al. Oral and salivary changes in patients with end stage renal disease (ESRD): a two year follow-up study. *Br Dent J.* 2007,Jan;202(2):E3. doi:10.1038/bdj.2007.47.

Brenner BM. Nephron adaptation to renal injury or ablation. *Am J Physiol.* 1985,Sep;249(3 Pt 2):F324-37.

Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, et al. Application of chemometrics to ^1H NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst.* 2003,Jan;128(1):32-36.

Buescher JM, Antoniewicz MR, Boros LG, et al. A roadmap for interpreting (^{13}C) metabolite labeling patterns from cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2015,Aug;34:189-201. doi:10.1016/j.copbio.2015.02.003.

Cardoso EM, Arregger AL, Tumilasci OR, et al. Assessment of salivary urea as a less invasive alternative to serum determinations. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69(3):330-334. doi:905852550 [pii]10.1080/00365510802588076.

Carpenter KL, Jalloh I, Hutchinson PJ. Glycolysis and the significance of lactate in traumatic brain injury. *Front Neurosci.* 2015, Apr;9-12. doi:10.3389/fnins.2015.00112.

Carvalho RA, Rodrigues TB, Zhao P, et al. A (^{13}C) isotopomer kinetic analysis of cardiac metabolism: influence of altered cytosolic redox and $[\text{Ca}^{2+}]_o$. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004, Sep;287(2):H889-95. doi:10.1152/ajpheart.00976.2003.

Carvalho RA, Sousa RP, Cadete VJ, et al. Metabolic remodeling associated with subchronic doxorubicin cardiomyopathy. *Toxicology.* 2010, Apr;270(2-3):92-8. doi:10.1016/j.tox.2010.01.019

Ceballos-Picot I, Witko-Sarsat V, Merad-Boudia M, et al. Glutathione antioxidant system as a marker of oxidative stress in chronic renal failure. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(6):845-53.

Chandra T, Das R, Datta AG. Role of thyroid gland on the peroxidase and iodinating enzymes of submaxillary gland. *Eur J Biochem.* 1977, Jan;72(2):259-63.

Chanutin A, Ferris EB. Experimental renal insufficiency produced by partial nephrectomy - I Control diet. *Arch of Intern Med.* 1932;49(5):767-87.

Cohen SM, Glynn P, Shulman RG. ^{13}C NMR study of gluconeogenesis from labeled alanine in hepatocytes from euthyroid and hyperthyroid rats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981, Jan;78(1):60-4.

Cohen SM, Shulman RG, McLaughlin AC. Effects of ethanol on alanine metabolism in perfused mouse liver studied by ^{13}C NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979, Oct;76(10):4808-12.

Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, et al. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int.* 2011;80(12):1258-70. doi:10.1038/ki.2011.368.

Dardamanis MA, Elisaf MS, Vasakos SA, et al. alpha-Amylase and isoamylase levels in renal transplant recipients compared to uremic patients. *Ren Fail.* 1995, Nov;17(6):715-9.

de Graaf RA, Rothman DL, Behar KL. State of the art direct ^{13}C and indirect ^1H - ^{13}C NMR spectroscopy in vivo. A practical guide. NMR Biomed. 2011,Oct;24(8):958-72. doi:10.1002/nbm.1761.

Deen WM, Maddox DA, Robertson CR, et al. Dynamics of glomerular ultrafiltration in the rat. VII. Response to reduced renal mass. Am J Physiol. 1974,Sep;227(3):556-62.

Delporte C, Steinfeld S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. Biochim Biophys. 2006,Aug;1758(8):1061-1070. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.022.

den Hollander JA, Brown TR, Ugurbil K, et al. ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of anaerobic glycolysis in suspensions of yeast cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979,Dec;76(12):6096-100.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. J Dent. 2005,Mar;33(3):223-233. doi:10.1016/j.jdent.2004.10.009.

Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. Am J Kidney Dis. 2006,Nov;48(5):752-60. doi:10.1053/j.ajkd.2006.08.015.

Edgar G, Wakefield RA. The kinetics of the conversion of creatine into creatinine in hydrochloric acid solutions. J Am Chem Soc. 1923;45:2242-5. doi:Doi 10.1021/Ja01663a003.

Edgar WM, Dawes C, O'Mullane DM. Saliva and oral health. London: British Dental Association; 2004.

El-Nahas AM. Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. Kidney Int. 2003,Nov;64(5):1553-63. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00255.x.

El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. Kidney Int. 2005,Dec;68(6):2918-29. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00774.x.

Ersson C, Thorman R, Rodhe Y, et al. DNA damage in salivary gland tissue in patients with chronic kidney disease, measured by the comet assay. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011,Aug;112(2):209-15. doi:10.1016/j.tripleo.2011.03.016.

Feldt-Rasmussen B, El Nahas M. Potential role of growth factors with particular focus on growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the management of chronic kidney disease. *Semin Nephrol.* 2009,Jan;29(1):50-58. doi:10.1016/j.semnephrol.2008.10.007.

Feldt-Rasmussen B, Lange M, Sulowicz W, et al. Growth hormone treatment during hemodialysis in a randomized trial improves nutrition, quality of life, and cardiovascular risk. *J Am Soc Nephrol.* 2007,Jul;18(7):2161-71. doi:10.1681/ASN.2006111207.

Ferreira FD, Nicolau J. Different responses of the submandibular salivary glands and liver of rats subjected to excess vitamin A: study on glycogen metabolism. *Int J Vitam Nutr Res.* 1985;55(3):239-44.

Ferreira JN, Hoffman MP. Interactions between developing nerves and salivary glands. *Organogenesis.* 2013,Jul-Sep;9(3):199-205. doi:10.4161/org.25224.

Fisher E, Stein E. Alpha amylase from human saliva. *Biochemistry Preparations.* 1961;8:27-33.

Galazzo JL, Bailey JE. In vivo nuclear magnetic resonance analysis of immobilization effects on glucose metabolism of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng.* 1989,Apr;33(10):1283-9. doi:10.1002/bit.260331009.

Gate L, Paul J, Ba GN, et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 1999,May;53(4):169-80.

Gil VMS, Geraldés CFGC. Ressonância magnética nuclear. Métodos e Aplicações. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian; 1987.

Goek ON, Prehn C, Sekula P, et al. Metabolites associate with kidney function decline and incident chronic kidney disease in the general population. *Nephrol Dial Transplant.* 2013,Aug;28(8):2131-8. doi:10.1093/ndt/gft217.

Goldman J, Rosales F, Villavicencio M, et al. Pathways of Glucose Metabolism in Rat Submaxillary Gland. *Biochim Biophys Acta.* 1964,Feb;82:303-12.

Guyton A. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. New York: Oxford Science Publications; 2003.

Hoffman MP, Kidder BL, Steinberg ZL, et al. Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. *Development*. 2002,Dec;129(24):5767-78.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001;85(2):162-169. doi:10.1067/mpr.2001.113778.

Hwang GS, Yang JY, Ryu do H, et al. Metabolic profiling of kidney and urine in rats with lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus by (1)H-NMR-based metabonomics. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010,Feb;298(2):F461-70. doi:10.1152/ajprenal.00389.2009.

Javanbakht MH, Sadria R, Djalali M, et al. Soy protein and genistein improves renal antioxidant status in experimental nephrotic syndrome. *Nefrologia*. 2014;34(4):483-90. doi:10.3265/Nefrologia.pre2014.Jun.12051.

Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013,Jul;382(9888):260-72. doi:10.1016/S0140-6736(13)60687-X.

Johnson DA, Yeh CK, Dodds MW. Effect of donor age on the concentrations of histatins in human parotid and submandibular/sublingual saliva. *Arch Oral Biol*. 2000,Sep;45(9):731-40.

Kao CH, Hsieh JF, Tsai SC, et al. Decreased salivary function in patients with end-stage renal disease requiring hemodialysis. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(6):1110-4. doi:10.1053/ajkd.2000.19810.

Kao CH, Tsai SC, Sun SS. Scintigraphic evidence of poor salivary function in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001,May;24(5):952-3.

Karatas F, Karatepe M, Baysar A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 2002,Dec;311(1):76-9.

Katchiburian E, Arana-Chavez VE. Histologia e embriologia oral - texto , atlas correlações clínicas. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan;2012.

Kauffman DL, Zager NI, Cohen E, et al. The isoenzymes of human parotid amylase. Arch Biochem Biophys. 1970;137(2):325-339.

Kaya M, Cermik TF, Ustun F, et al. Salivary function in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. Ann Nucl Med. 2002, Apr;16(2):117-20.

Kho HS, Lee SW, Chung SC, et al. Oral manifestations and salivary flow rate, pH, and buffer capacity in patients with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88(3):316-9. doi:S1079-2104(99)70035-1 [pii].

Kinashi M, Ohbayashi S, Ohbayashi M. Detection of amyloid-like fibrils using labial salivary gland biopsy in patients with nondialysis renal insufficiency. Am J Nephrol. 1989;9(5):435-7.

Kirschenlohr HL, Griffin JL, Clarke SC, et al. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. Nat Med. 2006, Jan;12(6):705-10. doi:10.1038/nm1432.

Klassen JT, Krasko BM. The dental health status of dialysis patients. J Can Dent Assoc. 2002, Jan;68(1):34-8.

Knosp WM, Knox SM, Hoffman MP. Salivary gland organogenesis. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2012, Jan-Feb;1(1):69-82. doi:10.1002/wdev.4.

Kopcansky P, Tomasovicova N, Koneracka M, et al. Structural changes in the 6CHBT liquid crystal doped with spherical, rodlike, and chainlike magnetic particles. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2008, Jul;78(1 Pt 1):011702.

Kraut JA, Madias NE. Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management. Nat Rev Nephrol. 2010, May;6(5):274-85. doi:10.1038/nrneph.2010.33

Kraut JA, Madias NE. Metabolic acidosis of CKD: an update. Am J Kidney Dis. 2016, Feb;67(2):307-17. doi:10.1053/j.ajkd.2015.08.028.

Leach SA. Release and Breakdown of Sialic Acid from Human Salivary Mucin and Its Role in the Formation of Dental Plaque. *Nature*. 1963, Aug;199:486-7.

Leighty RW, Antoniewicz MR. Dynamic metabolic flux analysis (DMFA): a framework for determining fluxes at metabolic non-steady state. *Metab Eng*. 2011, Nov;13(6):745-55. doi:10.1016/j.ymben.2011.09.010.

Li W, Bian F, Chaudhuri P, et al. Delineation of substrate selection and anaplerosis in tricarboxylic acid cycle of the heart by ¹³C NMR spectroscopy and mass spectrometry. *NMR Biomed*. 2011, Feb;24(2):176-87. doi:10.1002/nbm.1569.

Limeres J, Garcez JF, Marinho JS, et al. Early tooth loss in end-stage renal disease patients on haemodialysis. *Oral Dis*. 2016, Sep;22(6):530-5. doi:10.1111/odi.12486.

Liu M, Park J, Wu X, et al. Shen-Kang protects 5/6 nephrectomized rats against renal injury by reducing oxidative stress through the MAPK signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2015, Oct;36(4):975-84. doi:10.3892/ijmm.2015.2328.

Llena-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006, Aug;11(5):E449-55.

Llorente P, Marco R, Sols A. Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads. *Eur J Biochem*. 1970, Mar;13(1):45-54.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951, Nov;193(1):265-75.

Mackenzie NE, Hall JE, Flynn IW, et al. ¹³C nuclear magnetic resonance studies of anaerobic glycolysis in *Trypanosoma brucei* spp. *Biosci Rep*. 1983, Feb;3(2):141-51.

Malaisse WJ, Ladriere L, Kadiata MM, et al. Metabolism of alpha-D-[1,2-¹³C]glucose pentaacetate and alpha-D-glucose penta[2-¹³C]acetate in rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys*. 2000, Sep;381(1):61-66. doi:10.1006/abbi.2000.1967.

Mansour TE. Studies on Heart Phosphofructokinase. Active and Inactive Forms of the Enzyme. *J Biol Chem*. 1965, May;240:2165-2172.

Martins C, Siqueira WL, de Oliveira E, et al. Salivary analysis of patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *Spec Care Dentist*. 2006,Sep-Oct;26(5):205-8.

Martins C, Siqueira WL,Guimaraes Primo LS. Oral and salivary flow characteristics of a group of Brazilian children and adolescents with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol*. 2008,Apr;23(4):619-24. doi:10.1007/s00467-007-0718-5.

Marzzoco A,Torres BB. *Bioquímica básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

McCaleb ML, Mevorach R, Freeman RB, et al. Induction of insulin resistance in normal adipose tissue by uremic human serum. *Kidney Int*. 1984,Feb;25(2):416-21.

Mehls O, Wuhl E, Tonshoff B, et al. Growth hormone treatment in short children with chronic kidney disease. *Acta Paediatr*. 2008,Sep;97(9):1159-64. doi:10.1111/j.1651-2227.2008.00845.x.

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, et al. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:445-69. doi:10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745.

Metzger DL, Kerrigan JR, Krieg RJ, Jr., et al. Alterations in the neuroendocrine control of growth hormone secretion in the uremic rat. *Kidney Int*. 1993,May;43(5):1042-8.

Miletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Front Oral Biol*.2010;14:1-20. doi:10.1159/000313703.

Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH. Oxygen consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol*. 1990,May;258(5 Pt 2):F1354-62.

Naugle K, Darby ML, Bauman DB, et al. The oral health status of individuals on renal dialysis. *Ann Periodontol*. 1998;3(1):197-205. doi:10.1902/annals.1998.3.1.197

Neurohr KJ, Barrett EJ, Shulman RG. In vivo carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of heart metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983, Aug; 80(6):1603-7.

Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001, Feb; 16(2):335-40.

Nicolau J, de Matos JA, de Souza DN, et al. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Oral Sci*. 2005, Jun; 47(2):111-6.

Nicolau J, Ganzerla E, de Souza DN. Glycogen content and activities of enzymes involved in the carbohydrate metabolism of the salivary glands of rats during postnatal development. *Arch Oral Biol*. 2003, Feb; 48(2):101-9.

Nicolau J. Fundamentos de bioquímica oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

Nicolau J, Ribeiro DM. Metabolism of glycogen in submandibular glands of rats. Alteration by NaF. *J Biol Buccale*. 1992; 20(2):97-102.

Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in the major salivary glands of rats. *Arch Oral Biol*. 1976; 21(11):659-61.

Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in vitro of the submandibular salivary glands (SMG) from mice injected with isoproterenol. *Gen Pharmacol*. 1983; 14(6):705-8.

Nicolau J, Souza DN, Nogueira FN. Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Braz Oral Res*. 2006, Apr-Jun; 20(2):108-13. doi:S1806-83242006000200004 [pii].

Nicolay K, Hellingwerf KJ, Kaptein R, et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of acetate metabolism in intact cells of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Biochim Biophys Acta*. 1982, Jun; 720(3):250-8.

- Nogueira FN, Santos MF, Nicolau J. Influence of streptozotocin-induced diabetes on hexokinase activity of rat salivary glands. *J Physiol Biochem.* 2005;61(3):421-7.
- Pallos D, Leao MV, Togeiro FC, et al. Salivary markers in patients with chronic renal failure. *Arch Oral Biol.* 2015,Dec;60(12):1784-8. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.09.008.
- Patel VN, Rebustini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation.* 2006;74(7):349-64. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00088.x.
- Patterson K, Catalan MA, Melvin JE, et al. A quantitative analysis of electrolyte exchange in the salivary duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(10):G1153-63. doi:10.1152/ajpgi.00364.2011.
- Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* 2002,May;8(3):117-29.
- Pedroso FI, Leal A, Rosa R, et al. Metabolism in vitro of the submandibular salivary gland from rats subjected to various nutritional conditions. *Arch Oral Biol.* 1976;21(9):499-502.
- Peralta-Ramirez A, Raya AI, Pineda C, et al. Acid-base balance in uremic rats with vascular calcification. *Nephron Extra.* 2014,Jul;4(2):89-94. doi:10.1159/000363298.
- Postorino M, Catalano C, Martorano C, et al. Salivary and lacrimal secretion is reduced in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2003,Oct;42(4):722-728.
- Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* 2007,Apr;133(1):3-18. doi:10.1016/j.autneu.2006.10.006.
- Purkerson ML, Hoffsten PE, Klahr S. Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney Int.* 1976,May;9(5):407-17.
- Rhee CM, Kalantar-Zadeh K, Streja E, et al. The relationship between thyroid function and estimated glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2015,Feb;30(2):282-7. doi:10.1093/ndt/gfu303.

Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol*. 2013;Jul;24(8):1330-8. doi:10.1681/ASN.2012101006.

Romero AC, Bergamaschi CT, de Souza DN, et al. Salivary Alterations in Rats with Experimental Chronic Kidney Disease. *PLoS One*. 2016;11(2):e0148742. doi:10.1371/journal.pone.0148742.

Roussa E. Channels and transporters in salivary glands. *Cell Tissue Res*. 2011;Feb;343(2):263-87. doi:10.1007/s00441-010-1089-y.

Savica V, Calã LA, Davis PA, et al. Hyperphosphoremia in kidney failure-salivary phosphate as a marker and possible target. *Clin Nephrol*. 2008;Mar;69(3):229.

Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):161-75.

Schieppati A, Remuzzi G. Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications. *Kidney Int Suppl*. 2005;Sep;(98):S7-S10. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.09801.x.

Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, et al. Inquérito brasileiro de diálise crônica 2013 - Análise das tendências entre 2011 e 2013. *Bras nefrol*. 2014;36(4):476-81. doi:10.5935/0101-2800.20140068.

Sreebny LM, Valdini A. Xerostomia. Part I: Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;66(4):451-8.

Sillerud LO, Shulman RG. Structure and metabolism of mammalian liver glycogen monitored by carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. 1983;Mar;22(5):1087-94.

Singh M, Singh VN, Venkitasubramanian TA. Early effects of excessive retinol intake on hepatic glycogen metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1976;Mar;173(1):93-9.

Small DM, Coombes JS, Bennett N, et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2012,May;17(4):311-21. doi:10.1111/j.1440-1797.2012.01572.x.

Soares AF, Viegas FJ, Carvalho RA, et al. Quantifying hepatic glycogen synthesis by direct and indirect pathways in rats under normal ad libitum feeding conditions. *Magn Reson Med*. 2009,Jan;61(1):1-5. doi:10.1002/mrm.21830.

Souza DN, Mendes FM, Nogueira FN, et al. Lithium induces glycogen accumulation in salivary glands of the rat. *Biol Trace Elem Res*. 2016,Feb;169(2):271-8. doi:10.1007/s12011-015-0434-0.

Spoto B, Pisano A, Zoccali C. Insulin resistance in chronic kidney disease: a systematic review. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016;ajprenal 00340 02016. doi:10.1152/ajprenal.00340.2016.

Sreebny LM, Valdini A. Xerostomia. Part I: Relationship to other oral symptoms and salivary gland hypofunction. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1988,Oct;66(4):451-8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0030-4220(88)90268-X.

Stepniewska J, Dolegowska B, Cecerska-Heryc E, et al. The activity of antioxidant enzymes in blood platelets in different types of renal replacement therapy: a cross-sectional study. *Int Urol Nephrol*. 2016,Apr;48(4):593-9. doi:10.1007/s11255-015-1204-9.

Sun F, Dai C, Xie J, et al. Biochemical issues in estimation of cytosolic free NAD/NADH ratio. *PLoS One*. 2012;7(5):e34525. doi:10.1371/journal.pone.0034525.

Suzuki M, Furuhashi M, Sesoko S, et al. Determination of creatinine-related molecules in saliva by reversed-phase liquid chromatography with tandem mass spectrometry and the evaluation of hemodialysis in chronic kidney disease patients. *Anal Chim Acta*. 2016,Mar;911:92-9. doi:10.1016/j.aca.2016.01.032.

Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, et al. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*. 1982,Feb;11(1):1-17.

Takahashi S, Morita T, Koda Y, et al. Gastrointestinal involvement of dialysis-related amyloidosis. *Clin Nephrol*. 1988,Sep;30(3):168-71.

Tavares LC, Jarak I, Nogueira FN, et al. Metabolic evaluations of cancer metabolism by NMR-based stable isotope tracer methodologies. *Eur J Clin Invest.* 2015,Jan;45 Suppl 1:37-43. doi:10.1111/eci.12358.

Tomas I, Marinho JS, Limeres J, et al. Changes in salivary composition in patients with renal failure. *Arch Oral Biol.* 2008,Jun;53(6):528-32. doi:10.1016/j.archoralbio.2008.01.006.

Tsianos EV, Dardamanis MA, Elisaf M, et al. The value of alpha-amylase and isoamylase determination in chronic renal failure patients. *Int J Pancreatol.* 1994,Apr;15(2):105-11.

Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007,Apr;18(2):237-44. doi:10.1016/j.semcdb.2007.01.006.

Tucker AS, Miletich I. Salivary glands: development, adaptations and disease. Karger; 2010.

Ugurbil K, Brown TR, den Hollander JA, et al. High-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance studies of glucose metabolism in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978,Aug;75(8):3742-6.

Uyeda K, Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *J Biol Chem.* 1965,Dec;240(12):4682-8.

Vatta MS, Hope SI, Prendes GM, et al. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002,Apr;22(2):65-71.

Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 2004,Sep;24(5):469-73.

Vesterinen M, Ruukonen H, Leivo T, et al. Oral health and dental treatment of patients with renal disease. *Quintessence Int.* 2007,Mar;38(3):211-9.

Voet D, Voet JG, Praut CW. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre:Artes Médicas;2000.

Wang JX, Merritt ME, Sherry D, et al. A general chemical shift decomposition method for hyperpolarized C metabolite magnetic resonance imaging. *Magn Reson Chem*. 2016, Aug; 54(8):665-73. doi:10.1002/mrc.4435.

Wei Q, Xiao X, Fogle P, et al. Changes in metabolic profiles during acute kidney injury and recovery following ischemia/reperfusion. *PLoS One*. 2014; 9(9):e106647. doi:10.1371/journal.pone.0106647.

Weiner DE. Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J Manag Care Pharm*. 2007, Apr; 13(3 Suppl):S1-9.

White SL, Chadban SJ, Jan S, et al. How can we achieve global equity in provision of renal replacement therapy? *Bull World Health Organ*. 2008, Mar; 86(3):229-37.

Yajamanam N, Vinapamula KS, Sivakumar V, et al. Utility of saliva as a sample to assess renal function and estimated glomerular filtration rate. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2016, Mar; 27(2):312-9. doi:10.4103/1319-2442.178549.

Yu B, Zheng Y, Nettleton JA, et al. Serum metabolomic profiling and incident CKD among African Americans. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014, Aug; 9(8):1410-17. doi:10.2215/CJN.11971113

Zalewska A, Zwierz K, Zolkowski K, et al. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Pol*. 2000; 47(4):1067-79.

Zhang Y, Kompa AR. A practical guide to subtotal nephrectomy in the rat with subsequent methodology for assessing renal and cardiac function. *Nephrology (Carlton)*. 2014, Sep; 19(9):552-61. doi:10.1111/nep.12279.

Anexo A- Pareceres do comitê de ética

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 019/2013 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Fernando Neves Nogueira** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Dano oxidativo e alterações energéticas em glândulas salivares no diabetes e na insuficiência renal crônica e possíveis benefícios da utilização de Vitaminas C e E**" do qual participam o(s) pesquisador(es) Ana Carolina Romero, Danilo Zepellini do Prado e Douglas Nasadal de Souza, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **19/11/2013**, com validade de **03 (três) anos**.

São Paulo, 19 de novembro de 2013.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Presidente da CEUA-FOUSP

*Recebido em data
SP 21/11/2013
CEUA
Z.*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7840-202

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **016/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Fernando Neves Nogueira** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa **"Avaliação de Alterações Metabólicas em Glândulas Salivares de Ratos no Diabetes e na Insuficiência Renal Crônica por Recurso à Análise de Isotopómeros de Carbono 13 por RMN"** do qual participa(am) o(s) pesquisador(es) **Flávia Kazuo Ibuki e Ana Carolina Romero**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **30/09/2014**, com validade de **03 (três) anos**.

São Paulo, 01 de outubro de 2014.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

*Recebido
09/10/14*