EMILY GANZERLA

**ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DE GLICOGÊNIO DAS
GLÂNDULAS SALIVARES DE RATOS DIABÉTICOS ALIMENTADOS
E EM JEJUM APÓS A INJEÇÃO DE SIALOGOGOS**

São Paulo
2008

Emily Ganzerla

**Alterações do metabolismo de glicogênio das glândulas salivares
de ratos diabéticos alimentados e em
jejum após a injeção de sialogogos**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Doutor, pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. José Nicolau

São Paulo
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ganzerla E. Alterações do metabolismo de glicogênio das glândulas salivares de ratos diabéticos alimentados e em jejum após a injeção de sialogogos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2008.

São Paulo, ____/____/2008

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente”.

Isaac Newton

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonieta e Alcindo, por terem priorizado minha educação desde a infância, pelo carinho, atenção e confiança que me permitiram chegar até este momento. Admiro muito vocês que foram capazes de me ensinar os princípios de vida que me guiam e refletem em todas as minhas realizações. Obrigada!

Ao meu marido, Ricardo, pela
compreensão, estímulo e pelas palavras
de carinho tão necessários em muitos
momentos. Te amo!

Ao meu irmão, Rogério,
pela segurança transmitida
desde meus primeiros anos
de vida até hoje. Você é único!!

À minha amiga-irmã, Mariana, pela ótima
convivência na Faculdade e no laboratório que
fez com que a nossa amizade transpusesse os
muros da Universidade. Obrigada pelo apoio e
carinho!

Ao Prof. Dr. José Nicolau pela dedicação e
paciência em todos esses anos de orientação.
Minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao Douglas, técnico do laboratório de Biologia Oral, pela ótima convivência e principalmente por me ensinar a trabalhar na bancada e no biotério, você foi imprescindível para minha formação.

Ao Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira que por acaso nos encontramos há 10 anos e desde então a pesquisa tem feito parte de minha vida, obrigada pela convivência, alegria e amizade.

A todos os amigos que estão ou que passaram pelo laboratório de Biologia Oral e fizeram parte direta ou indiretamente da minha formação Fausto, Monique, Walter, Paulinha, Ana Paula, Marcela, Jonas, Alyne, Mariana, Helena e Flávia. O clima agradável e acolhedor que existe no laboratório fizeram com que eu me sentisse em família. Obrigada a todos!

Ao tio Carlos, tia Doni, Marcela, Márcia, Júnior e Rafael que passaram a ser parte de minha família após meu casamento, obrigada pela acolhida, compreensão, apoio e carinho.

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários, Rosa, Leonardo, Carlos Francci, Igor, Rafael, Braga, Josete, Capel, Walter, Paulo César, Muench e Fortunato.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários, Rosa Cristina, Mírtes, Antônio e Sílvia.

Aos animais que tiveram suas vidas sacrificadas em nome da ciência.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro do projeto no qual esta tese faz parte.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado e da taxa de bancada.

Ganzerla E. Alterações do metabolismo de glicogênio das glândulas salivares de ratos diabéticos alimentados e em jejum após a injeção de sialogogos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2008.

RESUMO

O processo de secreção salivar é dependente de energia, consome glicose e pode mobilizar glicogênio na glândula submandibular. Nos ratos diabéticos a produção de saliva estimulada é reduzida e ocorre acúmulo de glicogênio nas glândulas parótida e submandibular. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* o metabolismo de glicogênio das glândulas salivares, submandibular e parótida, de ratos diabéticos após o estímulo com agonistas colinérgico e adrenérgico e também analisar se os animais alimentados ou com restrição alimentar *overnight* apresentam diferenças no metabolismo de glicogênio das glândulas salivares nas condições estudadas. Os ratos foram divididos em grupos controles (C) e diabéticos (D). Após 30 dias da indução do diabetes com estreptozotocina i.p. 60mg/kg p.c., os animais foram subdivididos em alimentados ou em jejum, anestesiados com pentobarbital 50mg/kg p.c. e hidrato de cloral 400mg/kg p.c, administrado i.p. 7,5 mg/kg p.c de pilocarpina ou 5 mg/kg p.c. de isoproterenol, os ratos foram eutanasiados 0(T0), 30(T30), 60(T60) and 120(T120) minutos após a injeção do agonista. As glândulas SM e P foram removidas e analisadas quanto ao conteúdo de proteína total, glicogênio, atividade da glicogênio sintase (GS) e da glicogênio fosforilase (GP), ativa (a) e total (t). Os dados foram analisados estatisticamente pelo ANOVA e o teste de Tukey ($p>0,05$). A concentração de proteína total não foi afetada pela doença diabetes, nem pela administração dos agonistas, mas apresentou-se maior nos grupos em

jejum quando comparados aos grupos alimentados. A concentração de glicogênio inicial foi maior nos ratos diabéticos quando comparados ao controles nas glândulas SM e P. O estímulo com a pilocarpina e com o isoproterenol na SM dos ratos alimentados e em jejum promoveu a degradação do glicogênio observada em T30 e posterior recuperação do conteúdo até o T120 nos grupos controles e diabéticos. Na P os agonistas não mobilizaram o glicogênio no grupo controle e sim no grupo diabético. As enzimas GP e GS tiveram a atividade alterada pelos agonistas e pela doença diabetes, porém não apresentaram um padrão nas condições estudadas. Os animais em jejum apresentaram menor conteúdo de glicogênio que os diabéticos nas glândulas SM e parótida e as enzimas GS apresentou um aumento na relação da forma ativa e total nos grupos em jejum e a GP apresentou menores valores que foi mais evidente na glândula SM. A injeção dos sialogogos apresentou efeitos diferentes no metabolismo de glicogênio das glândulas P e SM, assim como nos animais diabéticos

Palavras-Chave: glândulas salivares, glicogênio, *diabetes mellitus*, estímulo adrenérgico, estímulo colinérgico

Ganzerla E. Glycogen metabolism alterations of fed and fast diabetic rats salivary glands after secretagogues injection [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2008.

ABSTRACT

The salivary secretion process is energy-dependent, consumes glucose and might mobilize glycogen in the submandibular glands. In diabetic rats the stimulated saliva flow rate is reduced and accumulate glycogen in submandibular (SM) and parotid (P). The aim of this work was evaluated *in vivo* glycogen metabolism in the SM and P of diabetic rats stimulated with adrenergic or cholinergic agonists, and to analyze if there are any differences in the glycogen metabolism in fed or unfed (alimentary fasting overnight) animals. The rats were divided in control (C) and diabetic (D) groups. Thirty days after diabetes induction with streptozotocin (60mg/kg b.w. i.p.), the animals were subdivided in fed or unfed, anaesthetized with pentobarbital (50mg/kg b.w. i.p.) and chloral hydrate (400mg/kg b.w. i.p.), injected pilocarpine (7.5mg/kg b.w.) or isoproterenol (5mg/kg b.w.) intraperitoneally, and euthanized 0(T0), 30(T30), 60(T60) and 120(T120) minutes post-injection of the agonists. SM and P were excised and assessed for glycogen and protein content and glycogen synthase (GS) and phosphorylase (GP) active (a) and total (t) activities. Data was statistically analyzed by ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$). Protein concentration didn't alter by diabetes or agonist injections but was higher in unfed when compared to the fed rats. Increased initial glycogen content was found in both groups of glands in diabetic rats when compared to the control group. Pilocarpine and isoproterenol stimulus promoted glycogen degradation in SM of fed and unfed rats on T30 and the T120 SM control and diabetic groups recovered glycogen content as the initial T0 values. In P the agonist mobilized glycogen just in diabetic group. The GP and GS activities were different and didn't present a pattern in this study's condition. The unfed animals present glycogen content diminished when compared to fed animal in both glands and the relation of active and total glycogen synthase was higher in fast animals and lesser specific activities of active and total glycogen phosphorylase that

were more evident in submandibular glands. The secretagogues injection presents different effects on glycogen metabolism of P and SM even so in diabetic animals.

Keywords: salivary glands, glycogen, *diabetes mellitus*, adrenergic stimulus, cholinergic stimulus

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
DAG	diacilglicerol
EROs	espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	flavina adenina dinucleotídeo
Fru 2,6 P ₂	frutose 2,6 bifosfato
GLUT	transportador de glicose
GP	glicogênio fosforilase
GS	glicogênio sintase
G1P	glicose 1-fosfato
G6P	glicose 6-fosfato
HK	hexoquinase
IP ₃	inositol trifosfato
IPR	isoproterenol
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
P	parótida
PFK-1	fosfofrutoquinase -1
PFK2	fosfofrutoquinase-2
Pi	fósforo inorgânico
PIP ₂	fosfatidil inositol di-fosfato

PK	piruvato quinase
PKA	piruvato quinase dependente de AMPc
PKC	piruvato quinase dependente de cálcio
PLC	fosfolipase C
SL	sublingual
SM	submandibular
STZ	estreptozotocina
UDPG	uridinadifosfoglicose

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Glândulas salivares.....	19
2.2 Diabete melito.....	23
2.3 Metabolismo de glicogênio.....	30
3 PROPOSIÇÃO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1 Animais.....	37
4.2 Obtenção das amostras.....	37
4.2.1 Glândulas salivares e sangue.....	38
4.3 Análises.....	38
4.3.1 Determinação da glicemia.....	38
4.3.2 Determinação de glicogênio glandular.....	39
4.3.3 Determinação de glicogênio fosforilase ativa e total.....	39
4.4.4 Determinação de glicogênio sintase ativa e total.....	40
4.4.5 Determinação de proteína total.....	42
4.4 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
6 DISCUSSÃO.....	79
7 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101
APÊNDICE	111
ANEXO	131

1 INTRODUÇÃO

O número de indivíduos com diabetes melito está aumentando com o crescimento populacional, aumento da expectativa de vida, urbanização, aumento da prevalência da obesidade e da inatividade física. O número de indivíduos portadores de diabetes no mundo em 2000 foi estimado em aproximadamente 171 milhões e as previsões é que no ano de 2030 esse número possa duplicar. No Brasil no ano 2000 foram estimados 4,6 milhões de portadores de diabetes e em 2030 a previsão é que esse número aumente para 11,3 milhões (WILD et al., 2004). Dentre as complicações orais causadas pelo diabetes temos a hipossalivação e a xerostomia. Além disso, alterações morfológicas e funcionais são reportadas em tecidos periféricos dentre eles as glândulas salivares.

As glândulas salivares são responsáveis pela produção de saliva que têm funções como a limpeza da cavidade oral, solubilização de substâncias alimentares, formação do bolo alimentar, facilita a mastigação e deglutição, inicia a digestão de carboidratos, remoção de bactérias e alimento da cavidade oral por meio da deglutição, lubrificação da mucosa, facilita a fala, proteção do dente devido a capacidade tampão que ela apresenta, permite a remineralização dental e participa da formação do biofilme do esmalte. Portanto a saliva tem um papel importante na saúde da cavidade oral e na qualidade de vida.

O processo de secreção de saliva é dependente de energia, consome glicose para a produção de adenosina trifosfato (ATP) e foi demonstrado que o estímulo com alguns sialogogos promove a degradação de glicogênio na glândula submandibular. O metabolismo de glicogênio da glândula salivar de ratos diabéticos

foi pouco estudado até o presente momento e apresentou acúmulo de glicogênio nas glândulas parótida e submandibular em ratos diabéticos. O metabolismo de glicogênio está diretamente relacionado com a disponibilidade de glicose obtida pela digestão dos alimentos, sendo que na condição pós-prandial observa-se um metabolismo voltado para a glicogenogênese e em períodos de jejum ocorre a glicogenólise.

O objetivo do nosso estudo foi avaliar o metabolismo de glicogênio *in vivo* de glândulas salivares de ratos diabéticos, alimentados ou em jejum, após o estímulo adrenérgico e colinérgico. Estudamos a concentração de glicogênio e de proteína total das glândulas submandibular e parótida e a atividade das enzimas glicogênio sintase ativa e total e da glicogênio fosforilase ativa e total, após a injeção intraperitoneal de pilocarpina e de isoproterenol e avaliamos o efeito nas glândulas salivares zero, 30, 60 e 120 minutos depois do estímulo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares são glândulas exócrinas que secretam seus produtos na cavidade oral. As glândulas salivares maiores parótidas (P), submandibulares (SM) e sublinguais (SL) são responsáveis por aproximadamente 90% da secreção salivar (PEDERSEN et al., 2002).

O parênquima glandular, derivado do ectoderma, consiste em unidades secretoras terminais e um sistema de ductos. As unidades secretoras terminais podem ser constituídas por células serosa, mucosas, seromucosas e por células mioepiteliais. As células serosas são especializadas na síntese e armazenamento de proteínas, e as células mucosas secretam pouco conteúdo enzimático e glicoproteínas com grandes cadeias de carboidratos, caracterizando o muco. As células mioepiteliais exercem funções de esvaziamento de secreção dessas estruturas. As unidades secretoras terminais abrem-se em ductos que vão se dividindo e aumentando de calibre até chegarem à cavidade oral, são eles: ductos intercalares, ductos granulares, ductos estriados e ductos excretores (WANG; PURUSHOTHAM; HUMPHREYS-BEHER, 1994), sendo que o ducto granular só está presente em morcegos e roedores (GRESIK, 1994). O tecido conjuntivo frouxo forma o estroma glandular, composto por uma cápsula e septos que dividem grupos de unidades secretoras e ductos em lobos e lóbulos. O estroma além de suportar o parênquima, contém os vasos sanguíneos, linfáticos e os nervos. A glândula salivar possui uma extensa rede vascular de artérias que nela penetram e se dividem em

arteríolas e o retorno venoso ocorre através de vênulas. A secreção das glândulas salivares é controlada por impulsos nervosos que chegam através de nervos secretores motores pós-ganglionares simpático e parassimpático que acompanham o percurso dos vasos sanguíneos até formarem plexos terminais junto ao parênquima. Além da regulação nervosa, alguns hormônios exercem controle sobre a função glandular, entre eles os estrógenos, glicocorticóides e os hormônios peptídicos, dentre eles o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), a substância P (SP) e o neuropeptídeo Y (NPY) (KATCHBURIAN; ARANÃ-CHAVES, 1999).

Os neurotransmissores são liberados pelas terminações nervosas, simpática e parassimpática e interagem com receptores específicos da membrana plasmática das células glandulares desencadeando uma série de reações envolvidas no processo secretório da saliva.

A acetilcolina é o principal neurotransmissor colinérgico que estimula as glândulas salivares ligando-se ao receptor muscarínico. As glândulas salivares têm os receptores muscarínicos M1, M2, M3, M4 e M5, mas apenas o M1 e o M3 estão diretamente relacionados com a produção de fluido salivar (TOBIN; GIGLIO; GOTRICK, 2002). Quando a glândula salivar é estimulada via inervação parassimpática ocorrerá ativação da via sinalizadora do Ca^{2+} /calmodulina através da proteína Gq que ativa a fosfolipase C (PLC) promovendo a hidrólise do PIP_2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) em IP_3 (trifosfato de inositol) e DAG (diacilglicerol) que serão responsáveis pela secreção de eletrólitos decorrente do aumento do cálcio intracelular pela ação do IP_3 e uma pequena quantidade de proteínas por meio do DAG que ativa a proteína quinase C (PKC) (BAUM, 1993).

Um neurotransmissor simpático, como a norepinefrina, ativa os receptores β -adrenérgicos promovendo uma mudança conformacional da proteína de membrana

Gs que libera uma subunidade catalítica que interage com a proteína adenilato ciclase, assim aumentando a concentração do segundo mensageiro AMPc que ativará a proteína quinase A (PKA) e conseqüentemente a extrusão de proteínas presentes nos grânulos de secreção da glândula por um processo denominado exocitose. (BAUM; COLPO; FILBURN, 1981). A Figura 2.1 demonstra o processo de secreção salivar após estímulo simpático e parassimpático.

Figura 2.1- Esquema representando o ácino celular. Este é um modelo obtido de resultados com células acinares de parótidas de ratos. Termos: β =receptor β -adrenérgico; VIP=receptor polipeptídeo vasointestinal; α =receptor α adrenérgico; MUSC=receptor colinérgico muscarínico; PEPT=receptor substância P; Gs=proteína G que estimula a adenilato ciclase; Gp=proteína G que estimula a fosfolipase C (PLC); PIP_2 =fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; DAG=diacilglicerol; IP_3 = inositol trifosfato. (Baum BJ. Principles of saliva secretion. Annals New York Academy Sciences 1993; 694:18)

O estímulo simpático produz uma saliva rica em muco e enzimas e causa uma vasoconstrição dos vasos sanguíneos que suprem as glândulas, assim reduzindo a velocidade de secreção (GUYTON; HALL, 1997) e o parassimpático induz um considerável fluxo salivar que contém pouca proteína (GARRETT et al., 1991b).

A pilocarpina é um agonista parassimpático com ação predominantemente muscarínica e sua utilização como sialogogo é comum, causando uma produção contínua de saliva, usualmente resultando em uma secreção aquosa (JOAN

HELLER BROWN, 1996). Nas células acinares de glândula salivar a pilocarpina estimula os receptores muscarínicos resultando num aumento de cálcio (Ca^{2+}) intracelular que ativa os canais de potássio (K^+) e também em menor intensidade os canais de cloro (Cl^-) estruturas envolvidas no processo de secreção de eletrólitos. Além disso, ela aumenta a expressão de aquaporina 5 (AQP-5) que é uma proteína de membrana responsável pela passagem de água da célula para o lúmen (LI et al., 2006).

O isoproterenol (IPR) é um potente agonista β -adrenérgico não seletivo com baixa afinidade pelos receptores α -adrenérgicos (HOFFMAN, 1996) que aumenta os níveis de AMPc no ácino, ativa a proteína quinase A (PKA) e desta forma estimula a secreção protéica (BAUM et al., 1981).

A produção de saliva não estimulada consome glicose em uma taxa baixa e constante e o estímulo com pilocarpina aumenta esse consumo (ANREP; CANNAN, 1922), assim como também aumenta o consumo de oxigênio glandular (DEUTSCH; RAPER, 1938). O IPR aumenta a glicólise (NICOLAU; SASSAKI, 1982), a via das pentoses (SASSAKI; NICOLAU, 1982) e a formação de ácido graxo livre (ALAM; ALAM, 1978) e após 18 horas do estímulo ocorre a formação de lactato na glândula SM (NICOLAU; SASSAKI, 1982)

2.2 Diabetes melito

Diabete melito é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia devido a defeitos na secreção de insulina ou uma redução da efetividade biológica da insulina, ou ambos (KUZUYA et al., 2002).

Essa doença é classificada etiologicamente nos quatro tipos citados a seguir: Tipo 1, Tipo 2, outros tipos (que incluem defeitos genéticos da função das células β ; defeitos genéticos da ação da insulina; doenças do pâncreas exócrino; endocrinopatias; indução química; infecções; formas incomuns de diabetes por mediação imune; outras síndromes genéticas associadas ao diabetes) e diabete melito gestacional (KUZUYA et al., 2002).

Nos diabéticos do Tipo 1, ocorre uma destruição das células B do pâncreas (95% dos casos é causada por um processo autoimune e nos outros 5% por causas idiopáticas), uma predisposição à cetoacidose e a necessidade de reposição da insulina. O Tipo 2 é uma forma mais prevalente, com desordem heterogênea que envolve um espectro de defeitos no funcionamento das células B, mas comumente está associada com resistência insulínica e a uma prejudicada secreção compensatória de insulina. Ambos os tipos de diabete apresentam fatores genéticos e ambientais como causas etiológicas (MASHARANI, 2001).

No diabete do Tipo 1 a insulina circulante está ausente, o glucagon plasmático elevado e as células pancreáticas falham em responder a qualquer estímulo insulinogênico. A ausência de insulina nos três principais tecidos alvos da insulina (fígado, músculo e adiposo) não apenas prejudica a absorção da glicose como mantém sua liberação na corrente sanguínea, assim como também de aminoácidos e ácidos graxos. Este persistente estado de jejum pós-prandial pode ser revertido com a administração de insulina (MASHARANI, 2001).

As principais manifestações clínicas da hiperglicemia são polifagia, poliúria, polidipsia e o hálito cetônico, presente mais comumente no diabetes melito Tipo 1. Embora a deficiência da insulina possa ser amenizada por meio de exercícios, pela dieta, injeção de insulina e terapia por agentes hipoglicemiantes orais, complicações crônicas não são totalmente contornadas.

A hiperglicemia crônica causa patologias microvasculares na retina, no glomérulo renal e nos nervos periféricos que caracterizam o diabetes e o torna a doença líder em causar cegueira, doenças renais em estágios terminais e uma variedade de neuropatias debilitantes. E ainda está associada com o aceleração da doença macrovascular aterosclerótica afetando artérias que suprem o coração, cérebro e extremidades inferiores. Existem quatro hipóteses de como a hiperglicemia possa causar essas complicações ilustradas na figura 2.2. e citadas a seguir: o aumento do fluxo da via de formação do poliol; aumento da produção de produtos finais de glicosilação avançada (advanced glycation ends products – AGE); ativação de isoformas de proteína quinase C e aumento do fluxo da via de hexosaminas (ROLO; PALMEIRA, 2006).

A via do poliol forma sorbitol que não se difunde facilmente pela membrana celular e causa estresse osmótico e danos microvasculares, além disso, o aumento desta via diminui a atividade da Na^+/K^+ ATPase, diminui o NADPH citossólico que é necessário para regenerar a glutatona reduzida assim gera estresse oxidativo e ainda diminui o NAD^+ citossólico, desta forma aumentando a razão NADH/NAD^+ (BROWNLEE; CERAMI, 1981).

O aumento da formação de AGES ocorre devido a auto-oxidação da glicose, da decomposição do produto de Amadori e da fragmentação do gliceraldeído 3 fosfato e da diidroxiacetona formando respectivamente glioxal, metilglioxal e 3-

deoxiglicosona que reagem com aminogrupos de proteínas intra e extracelulares formando AGEs, que alteram funções protéicas, modificam componentes da matriz celular como as integrinas e se ligam a receptores de células endoteliais gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (BROWNLEE; CERAMI, 1981).

A ativação de isoformas da PKC ocorre devido ao aumento do DAG originário do glicerol 3 fosfato e também por meio do aumento da via do polioli e do aumento de AGEs causando redução na produção do óxido nítrico (NO) e aumento do endotelina-1 o que altera o fluxo sanguíneo na retina e no rim (BROWNLEE; CERAMI, 1981).

Figura 2.2- Mecanismos moleculares que relacionam a hiperglicemia com o aumento da via de formação de polioli, da via das hexosaminas, formação de EROs e estimulação de PKC. (Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2006, 212 (2):169)

O aumento do fluxo da via da hexosamina está relacionado com a produção pela via glicolítica de frutose 6-fosfato que é substrato para a formação de UDP-N-

acetilglicosamina o que altera a transcrição gênica, também é substrato para a síntese de proteoglicanas e oxidação de glicoproteínas (BROWNLEE; CERAMI, 1981).

Uma das formas que a hiperglicemia poderia ocasionar essas mudanças propostas acima seria a partir da produção de EROs, pois a hiperglicemia induz o excesso dos doadores na transferência de elétrons (NADH e FADH_2) que ocorre na cadeia respiratória da mitocôndria gerando o aumento do radical livre ânion superóxido (ROLO; PALMEIRA, 2006).

Figura 2.3- Hiperglicemia induz a geração de EROs e conseqüentemente ativa direta ou indiretamente vias patológicas. (Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2006, 212 (2):168

Além das implicações gerais, também ocorrem manifestações bucais associadas ao diabetes: xerostomia; diminuição do paladar; aumento da incidência de sialoadenose; predisposição à cárie dental, doenças periodontais e abscessos dentais que levam à perda dos dentes; aumento das lesões na mucosa e língua;

predisposição a infecções bacterianas, virais e fúngicas; alterações ósseas. Essas alterações não são consenso na literatura e deve-se levar em consideração a idade, o controle glicêmico e o tipo de diabetes que o indivíduo é portador. (DARNELL; SAUNDERS, 1990; GIGLIO; LAMA, 2001; MANFREDI et al., 2004; MOORE et al., 2001; TAKEDA et al., 2006).

O diabetes experimental pode ser induzido por agentes químicos que destroem as células β do pâncreas, como a estreptozotocina e aloxana que são comumente usadas em ratos (SZKUDELSKI, 2001). Essas drogas têm sido usadas para avaliar os efeitos do diabetes em muitos tecidos, dentre eles as glândulas salivares de ratos

A xerostomia é uma das reclamações orais comum entre os indivíduos diabéticos e a hipossalivação não é constatada em todos os estudos. Em ratos diabéticos temos relatos de aumento (ANDERSON; GARRETT, 2004), diminuição (VATTA et al., 2002) e nenhuma alteração do fluxo salivar (WATANABE; YAMAGISHI-WANG; KAWAGUCHI, 2001)). A análise da saliva de diabéticos apresentou algumas variações não consensuais como diminuição, aumento ou nenhuma alteração na atividade de amilase, peroxidase, e na concentração de proteína total (ANDERSON et al., 1993; ANDERSON; SHAPIRO, 1980; DODDS; DODDS, 1997; NEWRICK et al., 1991)).

As glândulas salivares de ratos diabéticos induzido por estreptozotocina, submandibular e parótida, apresentaram diferentes alterações no sistema antioxidante, sendo que a SM apresentou aumento do malondialdeído, um indicativo de peroxidação lipídica, aumento do conteúdo da glutathiona reduzida e oxidada enquanto que a glândula parótida apresentou aumento da atividade da catalase e da glutathiona peroxidase (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005).

No diabetes, anormalidades microvasculares decorrentes de mudanças no tônus muscular e disfunções endoteliais são comuns e em glândulas SM com o estímulo simpático ocorre normalmente a vasoconstrição e com o estímulo parassimpático a vasodilatação, porém nos ratos diabéticos a magnitude e a duração da vasoconstrição e vasodilatação estão reduzidas quando comparadas ao controle (ANDERSON; GARRETT, 2004).

O peso glandular e alguns componentes glandulares foram estudados e ainda encontramos dados conflitantes na literatura. Em 1979, Anderson e colaboradores mostraram que após quarenta dias da indução do diabetes com aloxana em ratos ocorreu uma diminuição do peso corpóreo e glandular, da atividade da peroxidase e da proteína total na parótida e a aplicação da insulina restaurou os parâmetros alterados até próximos aos níveis encontrados no controle (ANDERSON; SHAPIRO, 1979). Outro estudo mostrou uma diminuição do peso corpóreo, da glândula parótida, um aumento da atividade da peroxidase, mas nenhuma alteração da proteína total e atividade da amilase nos ratos diabéticos (ANDERSON et al., 1989). Quanto ao ácido siálico, existem relatos que mostram um aumento (NICOLAU; ROSA; FAVA DE MORAES, 1962), diminuição (MICKELEBOROUGH, 1967) ou nenhuma diferença significativa (ZEBROWSKY, 1978) na SM de ratos diabéticos quando comparados com controles.

O metabolismo de carboidratos na SM de ratos diabéticos de quatro semanas mostrou aumento da atividade da fosfofrutoquise-1 (PFK-1), uma redução da atividade da fosfofrutoquise (PFK-2), bem como do metabólito frutose-2,6bifosfato (Fru 2,6 P₂), nenhuma diferença foi encontrada na parótida (NOGUEIRA, 2006). E as glândulas P e SM de ratos diabéticos apresentaram redução na atividade da hexoquinase (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005).

A resposta das glândulas salivares de animais diabéticos a diversos estímulos nervosos também é diferente dos animais saudáveis. Em camundongos diabéticos por duas semanas ocorreu uma diminuição de saliva total de aproximadamente 50% quando estimulada com pilocarpina ou isoproterenol e não alterou quando estimulada com fenilefrina (MURAI et al., 1996).

A estimulação do nervo simpático e parassimpático de glândulas P e SM de ratos diabéticos há seis meses causou um aumento do fluxo na SM de ratos diabéticos quando o estímulo foi simpático e uma diminuição em parótidas quando estimulado o parassimpático (ANDERSON et al., 1993).

Kimura encontrou menor fluxo de saliva total de ratos diabéticos quando comparado com ratos saudáveis frente ao estímulo com pilocarpina, porém não se alterou com noradrenalina nos ratos diabéticos, já a secreção de proteína total diminuiu com ambos os estímulos (KIMURA et al., 1996) e Watanabe, Yamagishi e Kawaguchi (2001) apresentou resultados semelhantes ao estudo anterior quanto ao fluxo com o estímulo da pilocarpina, sendo que a redução não foi decorrente da desidratação e sim de uma diminuição da susceptibilidade dos receptores muscarínicos das glândulas P e SM (WATANABE; YAMAGISHI-WANG; KAWAGUCHI, 2001).

2.3 Metabolismo de Glicogênio

A glicose é a principal fonte de energia para a vida e o nosso organismo armazena a glicose em forma de glicogênio. Entre as refeições o glicogênio do

fígado é o responsável por manter a glicemia do nosso organismo e durante o exercício físico ele é a fonte de glicose para o músculo.

O glicogênio é um polímero ramificado de glicose, com peso molecular aproximado de 10^7 daltons que apresenta uma cadeia aproximada de 1-11 resíduos de glicosil, sendo que uma molécula de glicogênio tem cerca de 4000 cadeias de glicosil (LOMAKO; LOMAKO; WHELAN, 1991).

Figura 2.4- Esquema da molécula de glicogênio. Cada círculo representa um resíduo de glicosil (faculty.stcc.edu/nash/macromolec.html)

As cadeias lineares são feitas por ligações α -1,4 e as cadeias ramificadas por ligações α -1,6.

Figura 2.5- Estrutura da partícula de glicogênio mostrando as ligações α -1,4, α -1,6 e as terminações não-reduzidas (STRYER, 1988)

Para a síntese de glicogênio (glicogenogênese) estão envolvidas duas enzimas, a glicogênio sintase responsável pela ligação α -1,4 e a enzima ramificadora responsável pela ligação α -1,6. Na degradação do glicogênio (glicogenólise) estão envolvidas as enzimas glicogênio fosforilase, responsável pela

clivagem da cadeia linear, a enzima glicana transferase e a enzima desramificadora (DEVLIN, 1998; HARRIS, 1986).

O mecanismo de controle e regulação do metabolismo do glicogênio pode ser alostérico ou por modificações covalentes. As duas principais enzimas, glicogênio sintase e fosforilase, responsáveis pela glicogenogênese e glicogenólise, respectivamente, podem estar na forma ativa ou inativa (DEVLIN, 1998)

A regulação por modificação covalente pode ser exemplificada via AMPc, que é um segundo mensageiro que ativa proteína quinase dependente de AMPc que então fosforila a enzima glicogênio fosforilase e a glicogênio sintase, desta forma favorece a glicogenólise e inibe a glicogenogênese, (FERRER et al., 2003). As catecolaminas sensibilizam os receptores α 1-adrenérgicos aumentando a concentração de cálcio intracelular pela via do IP_3 e DAG já citada anteriormente. A concentração de cálcio aumentada e a presença da proteína calmodulina nas células musculares favorecem a fosforilação de enzimas podendo aumentar a glicogenólise em mais de cem vezes, pois o cálcio se liga a um sítio catalítico da fosforilase quinase que ativa rapidamente a glicogênio fosforilase que atua na glicogenólise. E a ativação alostérica pode ser exemplificada com a glicose-6P uma ativadora alostérica da sintase, assim como o glicogênio, no músculo, é um efector inibidor desta enzima (FERRER et al., 2003).

A insulina e o glucagon são hormônios produzidos respectivamente, pelas células β e α do pâncreas e que exercem ações importantes no metabolismo de carboidratos. Os efeitos endócrinos da insulina são: no fígado, reverte o processo de catabolismo (inibe a glicogenólise, a conversão de aminoácido e ácidos graxos a cetoácidos) e tem ações anabólicas (promove a síntese de glicogênio e de triglicerídeo); no músculo, aumenta a síntese de proteínas e de glicogênio; no tecido

adiposo, aumenta o armazenamento de triglicerídeo. A insulina atua em períodos pós prandiais e no jejum sua concentração circulante diminui, o glucagon é secretado e o quadro metabólico é o inverso do citado anteriormente (MASHARANI, 2001).

No metabolismo de glicogênio em períodos pós-prandiais ocorre um aumento da glicemia, estimulando a produção de insulina que tem papel de primeiro mensageiro na entrada de glicose nas células, função esta das proteínas transportadoras de glicose, no caso do fígado, o GLUT 2. A glicose intracelular é fosforilada pela hexoquinase IV, denominada glicoquinase no fígado. A glicose 1P é transformada a glicose 6P (G6P) na presença da enzima fosfoglicomutase. Em caso de excesso de G6P, quando esta não é mais utilizada pela via glicolítica, a G6P é revertida novamente a G1P que é transformada em uridinadifosfoglicose (UDPG) pela ação da UDPG pirofosforilase, tornando-se um substrato para a enzima glicogênio sintase (GS) que a incorpora numa terminação não reduzida da molécula de glicogênio. A insulina, também age no músculo, ativando a proteína quinase que fosforila e ativa a fosfoproteína fosfatase 1 que promoverá a desfosforilação da glicogênio sintase, assim ativando-a (DEVLIN, 1998).

Em estado de jejum ocorre a secreção do glucagon que estimula o aumento de AMPc no fígado, ativa a proteína quinase dependente de AMPc, esta fosforila a fosforilase quinase que ativa a glicogênio fosforilase (GP), formando glicose 1P. Quando ocorre a contração muscular o nível de Ca^{2+} aumenta também favorecendo a degradação do glicogênio neste tecido. O jejum inibe a via das pentoses, prejudica a glicólise e ativa a gliconeogênese. O fígado obtém glicose a partir de precursores periféricos como aminoácidos, lactato e glicerol.

O processo de secreção salivar degrada glicogênio quando estimulado com agonistas adrenérgicos ou colinérgicos como norepinefrina, carbacol (ROSSIGNOL, 1974), IPR (FAVA-DE-MORAES; NICOLAU, 1975) e pilocarpina (NICOLAU; DE SOUZA; MARTINS, 1992). O consumo do glicogênio no processo de produção de saliva estimulada foi observado nos grânulos de secreção dos ductos granulares da SM de ratos, (GARRETT et al., 1994; THOMOPOULOS; GARRETT; PROCTOR, 2002; THOMOPOULOS et al., 1996), nos ductos estriado de SL de ratos quando o estímulo é simpático o que não ocorreu no estímulo parassimpático provavelmente devido a diferença na inervação desta glândula (GARRETT; ANDERSON, 1991), porém em ducto estriado de SM de gatos ambos estímulos promoveram a redução do glicogênio (GARRETT; KIDD, 1975).

O conteúdo de glicogênio se comporta de maneira diferente nas glândulas salivares maiores (SM, SL e P) de camundongos tratadas com isoproterenol, sendo que após sua administração o glicogênio atingiu um valor mínimo em 2 horas na parótida e em 6 horas na SM e SL. Após 12 e 24 horas o glicogênio retornou os valores normais na P e SL. Na SM após 18 horas o glicogênio alcançou o dobro do glicogênio controle (FAVA-DE-MORAES; NICOLAU, 1975).

O carbacol (agonista muscarínico) dispara a degradação do glicogênio em glândulas SM, e quando incubadas com carbacol e atropina (antagonistas muscarínicos) o glicogênio não apresenta alterações (ROSSIGNOL, 1974).

A glândula SM de ratos tratados com pilocarpina apresentou uma diminuição de 60% no conteúdo de glicogênio após 30 minutos da injeção, sendo que com o passar do tempo 60 e 120 minutos a diminuição foi de 35 e 22%, respectivamente, sugerindo que ocorre uma recuperação do glicogênio degradado, embora ainda não

tenha alcançado níveis semelhantes ao controle até o período estudado (NICOLAU; DE SOUZA; MARTINS, 1992).

O estado de nutrição (alimentados ou em jejum) influenciou a resposta do glicogênio do fígado e do músculo em ratos saudáveis e diabéticos, frente ao estímulo com isoproterenol. Em ratos saudáveis e alimentados o IPR provoca degradação de glicogênio em músculo e no fígado permanece igual. Em ratos diabéticos tratados com insulina e alimentados o IPR produziu diminuição de glicogênio em músculo e um leve aumento em fígado. Em ratos diabéticos tratados com insulina e em jejum o IPR reduziu 43% do glicogênio em fígado e de 50% no músculo (POTTER; ELLIS, 1974), o que nos mostra a influência tanto da doença quanto do estado de nutrição no conteúdo de glicogênio.

Gannon relatou uma diminuição do conteúdo de glicogênio hepático de ratos diabéticos alimentados ou em jejum quando comparados com o grupo controle alimentado. A glicogênio sintase ativa diminuiu nos ratos alimentados quando comparados com o grupo jejum e a glicogênio sintase total aumentou no grupo diabético. (GANNON; NUTTALL, 1997).

Nas glândulas P e SM de ratos diabéticos por dois meses observou-se um aumento do glicogênio, aumento da atividade da glicogênio sintase ativa e total e diminuição da atividade glicogênio fosforilase quando comparadas com controle (NICOLAU et al., 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Pouco se conhece sobre metabolismo de glicogênio de glândulas salivares de ratos diabéticos e sobre o envolvimento do glicogênio nas glândulas SM e P quando ocorre o processo de secreção salivar. A condição do animal, alimentado ou em jejum, interfere no metabolismo de glicogênio de vários órgãos. A proposta desta pesquisa é a de estudar *in vivo* o metabolismo de glicogênio das glândulas SM e P de ratos diabéticos, com e sem privação alimentar de uma noite, e que foram submetidos à administração de sialogogos adrenérgico e colinérgico.

O metabolismo de glicogênio foi estudado utilizando os parâmetros da determinação do conteúdo de glicogênio e das atividades das enzimas glicogênio fosforilase e glicogênio sintase na forma ativa e total e a relação da atividade entre as duas formas. Esses parâmetros foram avaliados nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos após o estímulo com pilocarpina e isoproterenol.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Ratos da raça Wistar, com peso corpóreo entre 200-250g foram mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso à água e alimento, e divididos em grupos controle e diabético.

A indução do diabetes foi realizada pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60mg/Kg p.c.) dissolvido em tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,5 em animais submetidos a jejum de aproximadamente 15 horas. Os animais controle receberam uma dose correspondente à dos experimentais apenas do tampão. Foram considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicemia em jejum igual ou superior a 250 mg de glicose/dL de sangue. Durante o período experimental a ingestão de alimento e água foram registrados. Decorridos 30 dias, os animais foram subdivididos em dois grupos, um com privação (subgrupo jejum) e outro sem privação de alimento (subgrupo alimentado). A retirada do alimento foi na noite anterior ao sacrifício por aproximadamente 14 horas.

Este estudo teve seu protocolo de pesquisa aprovado pela Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP, parecer 16/04 (Anexo A).

4.2 Obtenção das amostras

4.2.1 Glândulas salivares e sangue

Após anestesia com pentobabital sódico (50mg/kg p.c) e hidrato de cloral (400mg/kg p.c) foi administrado nos ratos, via injeção intraperitoneal, os agonistas adrenérgico (isoproterenol -5,0mg/kg de peso corpóreo) ou colinérgico (pilocarpina - 7,5mg/kg de peso corpóreo). Os animais foram sacrificados após 0, 30, 60 e 120 minutos da aplicação dos agonistas por destroncamento cervical, sempre no mesmo horário da manhã (entre 9h00 e 11h00), a fim de minimizar a influência do ritmo circadiano. No dia do sacrifício foi determinada a glicemia final, antes da injeção de sialogogos. O sangue foi coletado para a análise da glicemia e as glândulas salivares imediatamente removidas, limpas de tecido aderente e prensadas entre placas de alumínio, previamente mantidas em gelo seco e que permaneceram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso, quando foram pesadas em balança analítica da marca Ohaus, modelo adventurer TM sem que ocorresse o descongelamento para a análise do conteúdo de glicogênio, a atividade das enzimas estudadas.

4.3 Análises

4.3.1 Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada pelo glicosímetro Accu-Chek Advantage II (Roche).

4.3.2 Determinação do glicogênio glandular

A concentração de glicogênio glandular foi determinada pelo método proposto por Sing, Sing e Venkitasubramanian (1976). As amostras de glândulas foram digeridas em hidróxido de potássio (KOH) 30% em banho fervente por 30 minutos. Após a digestão, o isolamento do glicogênio foi feito através da adição de solução de sulfato de sódio (Na_2SO_4) saturada e etanol 95%, a mistura foi mantida em ambiente a 4°C por 15 minutos e centrifugado a 3020g por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. Durante o processo de purificação do glicogênio isolado foi utilizado ácido tricloroacético (TCA) 5% como reagente desproteinizante, etanol absoluto, solução de etanol/éter 3:1 e finalmente éter sulfúrico. Entre cada tratamento o material era centrifugado a 3020g por 20 minutos sendo o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado. O sedimento de glicogênio é diluído em água e a dosagem do glicogênio e do padrão de glicose 1mg/ml é realizada pela titulação com reagente de antrona 0,2% em ácido sulfúrico concentrado. Após banho-maria fervente por 10 minutos, a cor desenvolvida foi medida em espectrofotômetro Beckman DU 68, a 620nm, utilizando cubetas de 3ml e caminho ótico de 1 cm.(SINGH; SINGH; VENKITASUBRAMANIAN, 1976).

4.3.3 Determinação da glicogênio fosforilase ativa e total

A glicogênio fosforilase foi determinada no sentido da síntese de glicogênio pelo método de Hue, Bontemps e Hers (1975) e o fósforo liberado foi determinado pelo método de Fiske e Subarow (1925). As glândulas foram homogeneizadas a 10% (p/v) em um meio contendo glicilglicina 30mM, etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA) 20mM, fluoreto de sódio (NaF) 100mM e glicogênio 0,5% com pH ajustado para 7,4 e após centrifugação a 2400g por 30 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi incubado por 30 minutos a 30°C num meio contendo glicose 1P 100mM, glicogênio 2%, NaF 0,3M e cafeína 1mM, dissolvido em uma solução de tampão imidazol 50mM pH6,8 para a análise da enzima ativa e outra alíquota foi incubada num meio contendo glicose 1P 100mM, glicogênio 2%, NaF 0,3M, adenosina monofosfato (AMP) 1mM, adenosina trifosfato (ATP) 3mM e sulfato de magnésio (MgSO₄) 5mM dissolvido em uma solução de tampão imidazol 50mM pH6,8 para determinação da atividade total da enzima (HUE; BONTEMPS; HERS, 1975)

Após a incubação, acrescenta-se TCA 1,2M para interromper a reação, solução de molibdato de amônio 2mM em solução de ácido sulfúrico 0,3N e a solução redutora de ácido ascórbico 0,1% para a determinação do fósforo formado durante o período de incubação. A cor obtida foi lida em espectrofotometro à 720nm no aparelho Beckman DU 68. Foi usado fósforo inorgânico 1μM/mL como padrão e cubetas de 1ml e caminho ótico de 1cm (FISKE; SUBAROW, 1925).

Uma unidade da atividade enzimática é definida como a atividade que cataliza a transformação de 1 μ mol de substrato por minuto. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

4.3.4 Determinação da glicogênio sintase ativa e total

A glicogênio sintase foi determinada pelo método proposto por Chiang (1977). As amostras foram homogeneizadas a 20% (p/v) em um meio contendo sacarose 25mM, EDTA 10mM, ditioneitol (DTT) 10mM e imidazol 100mM com pH 7,4 e centrifugadas por 10 minutos à 9650g. Aliquotas do sobrenadante são incubadas em diferentes meios para a determinação da glicogênio sintase ativa e total, por 30 minutos à 37°C dando como produto desta incubação a uridina difosfato (UDP). O meio de incubação contém, glicilglicina 250mM, EDTA 50mM, uridinadifosfoglicose (UDPG) 50mM, DTT 50mM, 1,2 mg de glicogênio e glicose 6 fosfato (G6P) 100mM, para a análise da enzima total sendo a G6P substituída por Na₂SO₄ 100mM na determinação da enzima ativa. Novamente ocorre uma segunda incubação a 37°C por 30 minutos após a adição de piruvato quinase (PK) 0,2U e fosfoenolpiruvato (PEP) 0.01M que promove a formação do piruvato. Adicionamos o cromógeno dinitrofluoridrazina (DNFH) 0,1%, hidróxido de sódio (NaOH) 5M e etanol 95% para a determinação do piruvato formado e então as alíquotas são lidas em espectrofotômetro à 520nm. Foi usada uma curva padrão de piruvato de sódio (CHIANG, 1977).

1ª. incubação:

2ª. incubação:

4.3.5 Determinação de proteína total

Os resultados das enzimas glicogênio sintase e fosforilase foram expressos em relação à quantidade de proteína total do tecido que será feita pelo método de Lowry et al. (1951), tendo como padrão uma solução de albumina 0,2mg/l. Neste método as proteínas em meio alcalino reagem com o cobre, formando um complexo que reduzirá o reativo de folin-ciocalteu, resultando em uma coloração azulada, que foi lida em espectrofotômetro Beckman DU 68 à 660nm (LOWRY et al., 1951).

4.4 Análise Estatística

Para a análise estatística das tabelas 5.1 e 5.2 foi usado o teste t de Student e nas tabelas 5.3 a 5.26 e nos apêndices A até U foram utilizados a análise de variância e o teste de contraste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados estão expressos nas tabelas 5.1 à 5.26.

A tabela 5.1 representa a média dos valores de peso corporal inicial e final (após 30 dias da injeção de estreptozotocina no grupo diabético ou de tampão citrato de sódio no grupo controle), a média dos 30 dias da ingestão de água e de alimento dos ratos controle e diabéticos e a glicemia inicial e final dos animais. O peso inicial foi semelhante para ambos os grupos, mas o peso final do grupo diabético foi menor que o grupo controle mostrando que o grupo controle ganhou em média 77g e o grupo diabético perdeu em média 20g no decorrer de 30 dias. A ingestão de água foi maior em 5,6 vezes para grupo diabético se comparado ao controle assim como a de alimento foi 1,5 vezes maior no grupo diabético.

A glicemia inicial foi aferida com todos os animais em jejum por uma noite, sendo que o grupo diabético apresentou glicemia maior que o grupo controle e maior que 250mg/dl de sangue em todos os animais. A glicemia final foi dividida em alimentado, para os animais que tiveram livre acesso ao alimento, e em jejum, para os animais que foram privados de alimento na noite anterior ao sacrifício. Os grupos alimentados apresentaram maior valor de glicemia que os em jejum e os grupos diabéticos maiores que os controles.

Na tabela 5.2 observamos a média do peso glandular e do peso glandular relativo ($\text{PGR} = \text{peso da glândula (g)} \div \text{peso corporal (g)} \times 100$) nas glândulas submandibular e parótida e a concentração de proteína total das glândulas dos animais alimentados e em jejum sem considerar o estímulo com os agonistas.

Ambas as glândulas apresentaram peso total menor no grupo diabético e o peso glandular relativo maior quando comparados ao grupo controle.

As glândulas SM e P dos animais controles e diabéticos em jejum apresentaram um aumento de proteína total quando comparados com os animais alimentados.

As tabelas 5.3 a 5.8 são referentes ao estudo com os animais alimentados (sem privação de alimento) e que foi injetado pilocarpina.

A tabela 5.3 representa os valores das médias da concentração de proteína total e do conteúdo de glicogênio da glândula SM. A concentração de proteína total foi similar nos animais sadios e diabéticos e não se alterou com o estímulo da pilocarpina. O conteúdo de glicogênio inicial (T0) foi maior nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle. O estímulo colinérgico promoveu degradação do glicogênio em 30 minutos e aos 60 e 120 minutos uma reposição. No grupo controle ocorreu uma degradação de 47% e no grupo diabético de 81%, no T60 o grupo controle aumentou em 1,5 vezes sua concentração se comparado com T30 enquanto o grupo diabético triplicou. No T120 o grupo controle alcançou os valores iniciais de glicogênio e o grupo diabético recuperou 67% de sua concentração inicial.

Na tabela 5.4 observamos a atividade da enzima glicogênio sintase ativa e total da glândula SM e a razão entre a forma ativa e total. A glicogênio sintase apresentou maior valor no T60 para o grupo controle na forma ativa e total. O grupo diabético apresentou o menor valor no T30 para a forma ativa e os maiores valores no T120 para a forma ativa e no T60 para a total. A razão da forma ativa e total da GS mostrou que 75% da enzima encontrava-se na sua forma ativa no T0 e 50% no

T120 para o grupo diabético e para todos os outros grupo essa relação permaneceu por volta de 20%

A tabela 5.5 representa a atividade da enzima glicogênio fosforilase ativa e total da SM e a razão entre a forma ativa e total. A enzima apresentou a maior atividade no T0 tanto na forma ativa quanto na total e valores semelhantes para o grupo controle e diabético. Nos outros tempos estudados apenas o grupo diabético reduziu a atividade da forma ativa a partir de 60 minutos da administração da pilocarpina. A razão da forma ativa e total foi semelhante entre os grupos controles e diabéticos e os valores diminuíram como tempo, com exceção do grupo controle no T120.

A tabela 5.6 representa os valores das médias das concentrações de proteína total e de glicogênio para a glândulas parótida. A concentração de proteína total foi semelhante para todos os grupos. A concentração de glicogênio inicial foi maior 2,5 vezes no grupo diabético quando comparado ao controle e não se alterou com o estímulo da pilocarpina no grupo diabético e o grupo controle degradou 22% do glicogênio inicial em 30 minutos e recuperou sua concentração inicial no T60. Embora o grupo controle tenha diminuído sua concentração em T30 esse valor só foi estatisticamente diferente do T120. O grupo diabético apresentou valores maiores de glicogênio que o controle nos tempos zero, 30 e 60 minutos.

A tabela 5.7 demonstra os resultados da atividade da glicogênio sintase ativa e total da P. A enzima na forma ativa e total do grupo controle apresentou um aumento gradativo com o decorrer tempo. No grupo diabético ocorreu um aumento dos valores na forma ativa e total no T30 que se manteve nos tempo seguintes, com exceção da forma total no T60 que teve uma redução atingindo valor menor que o inicial. A razão da forma ativa e total no grupo controle manteve-se ao

redor de 80% no T0 e no T30 e diminuiu no T60 e no T120 alcançando 39%, o grupo diabético apresentou valores próximos a 20% com exceção do T60 com 83%.

A tabela 5.8 representa a atividade da glicogênio fosforilase ativa e total da P e a razão da forma ativa e total. A enzima ativa do grupo controle diminuiu no T30 e foi aumentando com o tempo até valores próximos ao T0, no grupo diabético diminuiu apresentando o menor valor em T60 e aumentou em T120. A forma total da enzima nos grupos controle e diabético diminuiu em T30, aumentou em T60 e diminuiu novamente em T120. A razão entre a forma ativa e total apresentou valores acima de 70% e apenas o tempo T60 apresentou valores menores tanto no grupo controle quanto no diabético.

As tabelas 5.9 a 5.14 são referentes ao estudo com os animais alimentados (sem privação de alimento) e que foi injetado isoproterenol.

A tabela 5.9 representa os valores das médias da concentração de proteína total e do conteúdo de glicogênio da glândula SM. A concentração de proteína total foi similar nos animais sadios e diabéticos e não se alterou com o estímulo do isoproterenol. O conteúdo de glicogênio inicial (T0) foi maior nos animais diabéticos quando comparados ao grupo controle. O estímulo adrenérgico não promoveu degradação do glicogênio no grupo controle, mas no grupo diabético o glicogênio reduziu 32% do valor inicial no T30 e manteve-se assim no T60 e T120.

A tabela 5.10 representa a atividade da glicogênio sintase ativa e total da glândula SM e a razão entre a forma ativa e total da enzima. A glicogênio sintase ativa manteve-se estável no grupo controle nos tempos estudados e no grupo diabético a atividade foi maior em T0 se comparado aos outros tempos. A forma total da enzima aumentou em T30 nos grupos C e D, diminuiu em T60 a valores similares aos iniciais e no T120 manteve-se assim no grupo diabético e aumentou novamente

no grupo controle alcançando um valor igual ao em T30. A razão entre a forma ativa e total da GS mostrou que 75% da enzima estava na forma ativa em T0 no grupo diabético e os outros grupos apresentaram uma relação menor que 34%.

Na tabela 5.11 observamos a atividade da glicogênio fosforilase ativa e total da glândula submandibular e a razão entre a forma ativa e total desta enzima. Os valores da atividade da GP ativa e total do grupo controle diminuíram até o T60 na forma ativa aumentou em T120, porém não alcançou o valor inicial. No grupo diabético as atividades da forma ativa e total da GP aumentaram no T30 e posteriormente diminuíram atingindo o menor valor em T60 para forma ativa e em T120 para forma total. A razão da forma ativa e total do grupo controle apresentou valores próximos a 50% com exceção do grupo T60 com 30% e o grupo diabético mostrou que cerca de 70% da enzima estava na forma ativa em T0 e T30 e em T60 está razão estava em 36%.

A tabela 5.12 demonstra os resultados referentes à concentrações de proteína total e de glicogênio da glândula P. A concentração de proteína total não se alterou nos grupos estudados. Quanto ao conteúdo de glicogênio a glândula P se comportou de maneira semelhante à SM mantendo-se estável no grupo controle e diminuindo 53% do valor inicial em T30 no grupo diabético e permanecendo assim até o T120.

A tabela 5.13 representa os valores da atividade da glicogênio sintase ativa e total da glândula P e a razão da forma ativa e total desta enzima. A GS no grupo C aumentou em T60 para a forma ativa e total e no grupo D a forma ativa aumentou em T120 e a forma total apresentou valores mais altos em T0 e T30. A razão entre a forma ativa e total apresentou o menor valor no T30 para o grupo controle e no

grupo diabético os valores foram próximos de 20% em T0 e T30 e aumentaram até o T120 alcançando 68%.

A tabela 5.14 demonstra os resultados da atividade da glicogênio fosforilase ativa e total da glândula parótida e a razão entre a forma ativa e total desta enzima. A GP ativa do grupo controle diminuiu no T30 e aumentou até o T120, o grupo diabético aumentou apenas em T120. A forma total da GP aumentou em T60 no grupo controle e manteve-se assim em T120 e o grupo diabético não variou a atividade nos tempos estudados. A razão da atividade da forma ativa e total no grupo controle foi 60% aproximadamente no grupo controle aumentando em T120 para 70% e o grupo D manteve-se acima de 80% com exceção no tempo T60 que foi 55%.

As tabelas 5.15 a 5.20 são referentes aos animais em jejum (com privação de alimento durante a noite anterior ao sacrifício) e que foram injetados com pilocarpina.

A tabela 5.15 representa os valores da média das concentrações de proteína total e de glicogênio da glândula SM. A concentração de proteína total foi igual para todos os grupos estudados. O conteúdo de glicogênio foi 0,4 vezes maior no grupo diabético se comparado com o controle. O estímulo com pilocarpina promoveu a degradação do glicogênio nos grupos controle e diabético no T30, 36% e 67% respectivamente. O grupo controle em T120 recuperou o conteúdo de glicogênio ultrapassando os valores iniciais de T0, já o grupo diabético manteve a concentração semelhante ao T30 nos tempo seguintes.

A tabela 5.16 representa os valores da atividade da glicogênio sintase ativa e total na glândula SM e a razão das formas ativa e total desta enzima. A glicogênio sintase ativa no grupo controle aumentou em cerca de 3 vezes no T30 em relação

aos outros tempos e o grupo diabético aumentou no T30 porém numa intensidade menor sendo diferente estatisticamente apenas do T120. A glicogênio sintase total no grupo controle e diabético aumentou no T30 e no T60. A razão entre a enzima ativa e total oscilou nos tempos estudados para os grupos controle e diabético.

A tabela 5.17 representa a atividade da glicogênio fosforilase ativa e total na glândula SM e a razão entre a forma ativa e total. A glicogênio fosforilase ativa e total no grupo controle aumentaram no T60 e no T120 e no grupo diabético a forma ativa apresentou o maior valor no T0 e a enzima total nos tempos T0 e T120. A razão da forma ativa e total no grupo controle aumentou até o T60 e diminuiu no T120 e o grupo diabético diminuiu gradativamente com o decorrer do tempo.

A tabela 5.18 demonstra os resultados referentes à concentrações de proteína total e de glicogênio da glândula P. A concentração de proteína foi igual nos grupos estudados. O conteúdo de glicogênio não se alterou no grupo controle e diminuiu 42% no T30 e voltou a valores iniciais em T60 no grupo diabético.

A tabela 5.19 representa a atividade da glicogênio sintase ativa e total na glândula P e a razão da forma ativa e total desta enzima. A enzima ativa e total no grupo controle apresentou um pico no T60 e a forma ativa no grupo diabético aumentou no T120 diferindo do T30 e T60 e na forma total apresentou um pico no T60 como o grupo controle. A razão entre a forma ativa e total apresentou o valor maior no grupo controle no T120 e o menor no grupo diabético no T60.

A tabela 5.20 demonstra os resultados da atividade da glicogênio fosforilase ativa e total da glândula parótida e a razão entre a forma ativa e total desta enzima. A atividade da glicogênio fosforilase ativa no grupo diabético foi menor no T120 e no T30 para o grupo diabético. A forma total apresentou valores semelhantes no grupo controle o menor valor no T30 para o grupo diabético. A razão entre as formas ativa

e total manteve-se acima de 70% com exceção do T30 para o grupo diabético e do T120 para o grupo controle.

As tabelas 5.21 a 5.26 são referentes aos animais em jejum (com privação de alimento durante a noite anterior ao sacrifício) e que foram injetados com isoproterenol.

A tabela 5.21 representa os valores da média das concentrações de proteína total e de glicogênio da glândula SM. A concentração de proteína total foi igual para todos os grupos estudados. O conteúdo de glicogênio diminuiu nos grupo controle e diabético após 30 e 60 minutos do estímulo com o isoproterenol e o grupo controle no T120 alcançou os valores iniciais e grupo diabético aumentou, porém não alcançou valores iniciais.

A tabela 5.22 representa os valores da atividade da enzima glicogênio sintase ativa e total da glândula SM e a razão entre a forma ativa e total desta enzima. O grupo controle não alterou a atividade da forma ativa com o decorrer do tempo e o grupo diabético aumentou a atividade nos tempos T60 e T120. A forma total da enzima no grupo controle apresentou o maior valor no T0 e o grupo diabético aumentou os valores no T60 e T120 como na forma ativa. O grupo controle apresentou valores próximos de razão entre a forma ativa e total, já o grupo diabético apresentou um pico no T60.

A tabela 5.23 representa a atividade da glicogênio fosforilase ativa e total na glândula SM e a razão entre a forma ativa e total. A forma ativa da enzima no grupo controle aumentou no T30 e permaneceu assim no tempos seguintes e o grupo diabético aumentou no T30 e no T120 retornou a valores semelhantes ao inicial. A forma total da enzima manteve-se igual no grupo controle nos tempos estudados e o grupo diabético aumentou em T30 e depois diminuiu em T120 aproximando-se dos

valores iniciais. A razão entre a forma ativa e total da enzima no grupo controle manteve-se entre 53 e 68% e grupo diabético apresentou valor acima de 80% no T0 e no T120.

A tabela 5.24 demonstra os resultados referentes à concentrações de proteína total e de glicogênio da glândula P. A concentração de proteína foi igual nos grupos estudados. O conteúdo de glicogênio não se alterou no grupo controle com exceção do T120 que foi maior cerca de 3 vezes o conteúdo de glicogênio dos outros tempos e o grupo diabético diminuiu 50% no T30 e aumentou em T120 ultrapassando os valores iniciais.

A tabela 5.25 representa a atividade da glicogênio sintase ativa e total na glândula P e a razão da forma ativa e total desta enzima. O grupo controle teve as maiores atividades da forma ativa no tempo T30 e no T120 e o grupo diabético diminuiu a atividade em T30 e manteve-se assim nos tempos seguintes. A atividade total da enzima aumentou nos tempos T30 e T120 no grupo controle e aumentou no T120 no grupo diabético. A razão entre a forma ativa e total apresentou os maiores valores no T60 para o grupo controle e no T0 para o grupo diabético.

A tabela 5.26 representa a atividade da glicogênio fosforilase ativa e total na glândula P e a razão entre a forma ativa e total. A glicogênio fosforilase ativa e total diminuíram no T30 no grupo controle e diabético sendo que no grupo diabético a forma ativa aumentou no T120 alcançando o valor similar ao inicial. A razão entre a forma ativa e total manteve-se acima de 70% com exceção do grupo controle no T60 e no T120.

Nos apêndices A até U encontram-se os resultados acima descritos que comparam estatisticamente os grupos alimentados com os em jejum.

Tabela 5.1- Peso corpóreo inicial e final, consumo de água e de alimento, glicemia inicial e final dos ratos controles (C) e diabéticos (D). A glicemia final foi separada entre os animais alimentados e em jejum

	Peso corpóreo (g)		Consumo de água (ml/dia)	Consumo de alimento (g/dia)	Glicemia inicial (mg/dl)	Glicemia Final (mg/dl)	
	Inicial	Final				Alimentado	Jejum
C	241±36	318±34	30±8,5	20,16±9,56	79±18	113±28	94±18
	(107)	(107)	(107)	(107)	(107)	(69) a	(38)*
D	238±26	218±46	169±32,6	30,3±8,2	380±122	531±87	385±110
	(106)	(106)*	(106)*	(106)*	(106)*	(75) a	(31)*

Média ± DP, número de amostras entre parênteses;

Teste t de Student, p<0,05;

*significa diferença entre controle e diabético;

“a” significa diferença entre os grupos jejum e alimentado.

Tabela 5.2- Peso glandular total (g), relativo (g/100g p.c.) e concentração de proteína (mg proteína/mg de tecido) das glândulas submandibular (SM) e parótida (P) dos ratos controles (C) e diabéticos (D). Os dados da concentração de proteína foram expressos considerando a condição alimentar e não o estímulo com agonistas

	Peso glandular total		Peso glandular relativo		Proteína			
	(g)		(g/100g p.c.)		(mg proteína/mg tecido)			
	SM	P	SM	P	SM		P	
					Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
C	0,217±0,041	0,257±0,071	0,066±0,011	0,078±0,022	4,32±0,49	4,99±0,82	4,11±0,59	4,86±0,93
	(214)	(214)	(214)	(214)	(80)	(78)a	(80)	(74)a
D	0,158±0,037	0,205±0,053	0,072±0,014	0,095±0,025	4,12±0,52	4,86±0,93	4,15±0,46	4,87±0,79
	(204)*	(198)*	(198)*	(192)*	(80)	(74)a	(80)	(74)a

Média ± DP, número de amostras entre parênteses;

Teste t de Student, p<0,05;

*significa diferença entre controle e diabético;

“a” significa diferença entre alimentado e jejum.

Tabela 5.3- Concentrações de proteína total (mg proteína/mg tecido) e de glicogênio (μg glicogênio/g tecido) em glândulas submandibulares de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados, após zero, 30,60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5mg/kc p.c.)

Submandibular				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/mg tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	4,42 $\pm 0,21$ a	4,24 $\pm 0,31$ a	1,44 $\pm 0,15$ a	2,51 $\pm 0,18$ a *
T30	4,29 $\pm 0,43$ a	4,26 $\pm 0,30$ a	0,76 $\pm 0,23$ b	0,48 $\pm 0,07$ b
T60	4,26 $\pm 0,29$ a	4,14 $\pm 0,65$ a	1,14 $\pm 0,18$ c	1,41 $\pm 0,39$ c
T120	4,08 $\pm 0,44$ a	4,14 $\pm 0,39$ a	1,64 $\pm 0,21$ a	1,70 $\pm 0,11$ c

Média $\pm$ DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey, $p > 0,05$

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.4- Atividade da glicogênio sintase ativa e total (mU/mg proteína) da glândula submandibular de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5mg/kg p.c.)

Submandibular						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	4,15 ±0,71 a	7,91 ±1,60 a	22,16 ±2,96 a	10,49 ±3,50 a *	0,18	0,75
T30	5,29 ±1,29 a,b	3,37 ±0,97 b	26,32 ±6,63 a	22,15 ±6,87 b	0,20	0,15
T60	8,54 ±1,61 b	9,47 ±3,84 a	41,85 ±3,49 b	41,79 ±6,08 c	0,20	0,23
T120	5,46 ±1,66 a,b	16,94 ±6,67 c *	33,00 ±5,37 c	36,07 ±9,05 c	0,16	0,47

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo;

Tabela 5.5- Atividade da glicogênio fosforilase ativa e total (U/mg proteína) da glândula submandibular de ratos diabéticos (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5mg/kg p.c.)

Submandibular						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,040 ±0,015 a	0,049 ±0,010 a	0,071 ±0,020a	0,074 ±0,017 a	0,56	0,66
T30	0,028 ±0,007 b	0,033 ±0,006 b	0,053 ±0,009 a,b	0,057 ±0,014 a,b	0,53	0,57
T60	0,022 ±0,007 b	0,019 ±0,004 c	0,045 ±0,014 b	0,045 ±0,013 b	0,42	0,42
T120	0,024 ±0,003 b	0,021 ±0,007 c	0,046 ±0,004 b	0,053 ±0,011 b *	0,52	0,39

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey, $p>0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.6- Concentrações de proteína total (mg/g tecido) e glicogênio (μg /mg tecido) em glândulas parótida (P) de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados, após zero, 30,60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5mg/kg p.c.)

Parótida				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/g tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	4,23 $\pm 0,67$ a	4,24 $\pm 0,41$ a	0,41 $\pm 0,10$ a,b	1,03 $\pm 0,19$ a *
T30	4,18 $\pm 0,51$ a	4,38 $\pm 0,63$ a	0,32 $\pm 0,06$ b	0,99 $\pm 0,32$ a *
T60	4,21 $\pm 0,32$ a	4,26 $\pm 0,28$ a	0,51 $\pm 0,14$ a,b	0,85 $\pm 0,23$ a *
T120	4,12 $\pm 0,49$ a	3,73 $\pm 0,28$ a	0,67 $\pm 0,08$ a	0,81 $\pm 0,22$ a

Média $\pm$ DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey, $p > 0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.7- Atividades das formas ativa e total da glicogênio sintase (mU/mg proteína) nas glândulas parótidas de ratos diabéticos (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5mg/kg p.c.)

Parótida						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	5,78 ±0,97 a	2,69 ±0,85 a	7,35 ±1,47 a	18,24 ±2,91 a *	0,78	0,15
T30	8,06 ±2,24 a,b	6,08 ±1,24 b	9,71 ±1,97 a	29,61 ±13,54 b *	0,83	0,20
T60	8,57 ±1,67 a,b	8,41 ±3,65 b	15,87 ±5,92 a	10,18 ±3,91 c	0,54	0,83
T120	10,01 ±2,51 b	6,39 ±1,25 b *	26,70 ±9,07 b	29,89 ±8,52 b	0,37	0,21

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.8- Atividades das formas ativa e total da glicogênio fosforilase (U/mg proteína) nas glândulas parótidas de ratos diabéticos (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5mg/kg p.c.)

Parótida						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,024 ±0,007 a	0,019 ±0,003 a	0,029 ±0,008 ^a	0,027 ±0,005 a	0,83	0,70
T30	0,013 ±0,005 b	0,013 ±0,004 b	0,020 ±0,006 b	0,014 ±0,005 b	0,93	0,93
T60	0,016 ±0,006 b	0,008 ±0,004 b *	0,025 ±0,004 a,b	0,022 ±0,004 a	0,64	0,36
T120	0,018 ±0,004 a,b	0,015 ±0,003 a,b *	0,020 ±0,003 b	0,019 ±0,004 a	0,90	0,79

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.9- Concentrações de proteína total (mg/g tecido) e de glicogênio (μg /mg tecido) em glândula submandibular de ratos diabético (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30,60 e 120 minutos da injeção de isoproterenol (5mg/kg p.c.)

Submandibular				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/g tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	4,66 $\pm 0,75$ a	4,41 $\pm 0,25$ a	1,05 $\pm 0,19$ a	1,65 $\pm 0,34$ a *
T30	4,43 $\pm 0,39$ a	4,01 $\pm 0,64$ a	1,04 $\pm 0,10$ a	1,13 $\pm 0,23$ b
T60	4,01 $\pm 0,64$ a	3,85 $\pm 0,44$ a	0,92 $\pm 0,22$ a	1,10 $\pm 0,30$ b
T120	4,38 $\pm 0,41$ a	4,10 $\pm 0,49$ a	1,08 $\pm 0,19$ a	0,90 $\pm 0,18$ b

Média $\pm$ DP, n=10

ANOVA e teste de Tukey $p < 0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.10- Atividade da glicogênio sintase ativa e total (mU/mgproteína) da glândula submandibular de ratos diabéticos (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de isoproterenol (5mg/kg p.c.)

Submandibular						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	7,48 ±2,23 a	21,93 ±6,17 a *	22,23 ±7,19 a	29,01 ±7,34 a	0,34	0,75
T30	7,21 ±0,91 a	6,50 ±0,84 b	31,48 ±4,31 b	38,37 ±4,15 b	0,23	0,17
T60	4,01 ±1,19 a	6,97 ±1,37 b	17,40 ±4,45 a	22,22 ±5,16 a	0,23	0,31
T120	6,98 ±2,42 a	5,85 ±0,81 b	30,62 ±10,07 b	24,61 ±4,45 a	0,23	0,24

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey p<0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo,

Tabela 5.11- Atividade da glicogênio fosforilase ativa e total (U/mg proteína) da glândula submandibular de ratos diabético (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de isoproterenol (5mg/kg p.c.)

Submandibular						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,034 ±0,013 a,b	0,035 ±0,003 a	0,067 ±0,008 a	0,044 ±0,004 a *	0,51	0,79
T30	0,029 ±0,013 b	0,060 ±0,011 b	0,054 ±0,006 b	0,081 ±0,015 b	0,53	0,74
T60	0,012 ±0,002 c	0,019 ±0,003 c	0,041 ±0,006 c	0,052 ±0,007 a	0,30	0,36
T120	0,021 ±0,006 c,b	0,025 ±0,005 a,c	0,037 ±0,006 a,c	0,045 ±0,007 a	0,57	0,55

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey p<0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.12- Concentrações de proteína total (mg/g tecido) e de glicogênio (μg /mg tecido) em glândula parótida (P) de ratos diabético (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30,60 e 120 minutos da injeção de isoproterenol (5mg/kg p.c.)

Parótida				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/g tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	4,11 $\pm 0,34$ a	4,29 $\pm 0,40$ a	0,71 $\pm 0,14$ a	1,52 $\pm 0,49$ a *
T30	4,15 $\pm 0,99$ a	4,19 $\pm 0,36$ a	0,66 $\pm 0,25$ a	0,72 $\pm 0,10$ b
T60	3,71 $\pm 0,41$ a	3,77 $\pm 0,36$ a	0,74 $\pm 0,23$ a	0,82 $\pm 0,17$ b
T120	4,15 $\pm 0,74$ a	4,08 $\pm 0,76$ a	0,68 $\pm 0,14$ a	0,54 $\pm 0,11$ b

Média $\pm$ DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey $p < 0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.13- Atividades das formas ativa e total da glicogênio sintase (mU/mg proteína) na glândula parótida de ratos diabético (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de isoproterenol (5mg/kg p.c.)

Parótida						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	5,21 ±1,21 a	3,79 ±0,55 a	8,39 ±2,12 a	20,57 ±1,47 a *	0,62	0,18
T30	4,73 ±1,19 a	3,87 ±1,49 a	12,17 ±3,59 a	25,05 ±4,03 b *	0,39	0,15
T60	13,52 ±2,55 b	3,98 ±0,64 a *	25,97 ±2,81 b	8,21 ±1,77 c *	0,52	0,48
T120	14,35 ±2,45 b	10,52 ±1,71 b	26,17 ±3,61 b	15,47 ±1,41 d *	0,55	0,68

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey p<0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.14- Atividades das formas ativa e total da glicogênio fosforilase (U/mg proteína) na glândula parótida de ratos diabético (D) e controle (C) alimentados, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de isoproterenol (5mg/kg p.c.)

Parótida						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,011 ±0,002 a,c	0,011 ±0,003 a	0,016 ±0,002 a	0,013 ±0,003 a	0,68	0,85
T30	0,008 ±0,001 c	0,011 ±0,003 a	0,013 ±0,001 a	0,016 ±0,006 a	0,61	0,81
T60	0,014 ±0,004 a,b	0,010 ±0,002 a *	0,023 ±0,007 b	0,018 ±0,002 a	0,61	0,55
T120	0,016 ±0,002 b	0,015 ±0,002 b	0,022 ±0,003 b	0,016 ±0,004 a	0,73	0,93

Média ± DP, n=10;

ANOVA e teste de Tukey p<0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.15- Concentrações de proteína total (mg proteína/mg tecido) e de glicogênio (µg glicogênio/mg tecido) em glândula submandibular de ratos diabético (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30,60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/mg tecido		µg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	5,46 ±0,47 a	4,63 ±0,71 a	0,87 ±0,11 a	1,39 ±0,16 a*
T30	4,48 ±0,94 a	5,02 ±0,71 a	0,56 ±0,04 b	0,46 ±0,07 b
T60	4,46 ±0,41 a	4,67 ±1,16 a	1,01 ±0,21 c,a	0,60 ±0,06 b
T120	5,03 ±1,42 a	5,31 ±0,48 a	1,19 ±0,16 c	0,60 ±0,04 b *

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.16- Atividade da glicogênio sintase ativa e total (mU/mg proteína) da glândula submandibular de ratos diabético (D) e controle (C) em jejum, após zero 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	1,84 ±0,72 a	9,92 ±3,72 a,b *	5,76 ±3,32 a	15,85 ±5,29 a *	0,32	0,62
T30	11,02 ±3,93 b	15,70 ±8,22 b	14,93 ±4,07 b	35,03 ±11,41 b *	0,74	0,45
T60	3,09 ±1,71 a	10,90 ±4,18 a,b *	19,66 ±3,05 b	28,96 ±2,14 b *	0,16	0,38
T120	2,21 ±0,66 a	7,17 ±0,79 a	5,19 ±1,61 a	8,55 ±3,54 a	0,42	0,84

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo;

Tabela 5.17- Atividade da glicogênio fosforilase ativa e total (U/mg proteína) da glândula submandibular de ratos diabético (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,008 ±0,001 a	0,031 ±0,005 a *	0,014 ±0,001 a	0,052 ±0,014 a *	0,57	0,59
T30	0,009 ±0,002 a	0,019 ±0,006 b, c *	0,013 ±0,003 a	0,036 ±0,011 b *	0,69	0,53
T60	0,023 ±0,004 b	0,015 ±0,003 b *	0,031 ±0,008 b	0,030 ±0,006 b	0,74	0,5
T120	0,018 ±0,002b	0,020 ±0,004 c	0,029 ±0,003 b	0,044 ±0,001 d,a *	0,62	0,45

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.18- Concentrações de proteína total (mg/g tecido) e glicogênio (μg /mg tecido) em glândula parótida de ratos diabético (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30,60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/g tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	5,11 $\pm 0,58$ a	4,48 $\pm 0,68$ a	0,39 $\pm 0,11$ a	0,65 $\pm 0,15$ a *
T30	4,89 $\pm 0,88$ a	5,48 $\pm 0,79$ a	0,39 $\pm 0,16$ a	0,38 $\pm 0,07$ b
T60	5,39 $\pm 1,04$ a	5,32 $\pm 0,31$ a	0,51 $\pm 0,15$ a	0,65 $\pm 0,16$ a
T120	5,51 $\pm 1,31$ a	4,88 $\pm 0,45$ a	0,54 $\pm 0,13$ a	0,65 $\pm 0,18$ a

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA e teste de Tukey, $p > 0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.19- Atividades das formas ativa e total da glicogênio sintase (mU/mg proteína) na glândula parótida de ratos diabético (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	3,12 ±0,84 a	5,23 ±1,46 a, b	5,07 ±2,00 a,c	10,21 ±3,15 a	0,61	0,51
T30	4,26 ±0,91 a	4,57 ±0,82 a	9,97 ±1,04 a	9,77 ±1,53 a	0,43	0,46
T60	22,54 ±3,75 b	3,31 ±1,20 a *	43,37 ±9,61 b	21,59 ±5,57 b *	0,52	0,15
T120	2,96 ±1,05 a	7,25 ±2,31 b *	3,59 ±0,92 c	13,89 ±2,35 a *	0,82	0,52

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.20- Atividades das formas ativa e total da glicogênio fosforilase (U/mg proteína) na glândula parótidas de ratos diabético (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,007 ±0,001a,b	0,016 ±0,004 a*	0,010 ±0,001 a,b	0,016 ±0,004 a *	0,7	1
T30	0,009 ±0,005 a,b	0,004 ±0,001 b*	0,010 ±0,003 a,b	0,007 ±0,001 b	0,9	0,57
T60	0,010 ±0,001 a	0,011 ±0,001 c	0,012] ±0,001 b	0,013 ±0,001 a	0,83	0,85
T120	0,004 ±0,001 b	0,009 ±0,001 c *	0,009 ±0,003 a	0,012 ±0,001 a *	0,4	0,75

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.21- Concentrações de proteína total (mg/g tecido) e de glicogênio (μg /mg tecido) em glândulas submandibulares de ratos diabéticos (D) e controles (C) em jejum, após zero, 30,60 e 120 minutos da estimulação com isoproterenol

Submandibular				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/g tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	5,16 $\pm 0,55$ a	5,12 $\pm 0,58$ a	1,29 $\pm 0,09$ a	1,41 $\pm 0,13$ a
T30	4,85 $\pm 0,41$ a	4,71 $\pm 0,94$ a	0,71 $\pm 0,31$ b	0,61 $\pm 0,15$ b
T60	4,90 $\pm 0,38$ a	4,72 $\pm 0,41$ a	0,66 $\pm 0,11$ b	0,33 $\pm 0,05$ c *
T120	5,72 $\pm 0,75$ a	4,83 $\pm 1,09$ a	1,27 $\pm 0,13$ a	0,80 $\pm 0,07$ b *

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA e teste de Tukey, $p > 0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.22- Atividade da glicogênio sintase (ativa e total) da glândula submandibular de ratos diabéticos (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da estimulação pelo sialogogo isoproterenol

Submandibular						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	7,66 ±0,65 a	4,93 ±1,11 a	32,01 ±6,91 a	15,63 ±6,78 a *	0,24	0,31
T30	4,54 ±1,39 a	6,77 ±1,90 a	11,41 ±2,71 b	13,25 ±1,88 a	0,39	0,51
T60	4,38 ±1,29 a	20,56 ±3058 b *	13,43 ±2,98 b	24,73 ±5,83 b *	0,32	0,83
T120	4,89 ±1,61 a	16,49 ±6,26 b *	16,13 ±1,88 b	29,27 ±11,91 b *	0,30	0,56

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo,

Tabela 5.23- Atividade da glicogênio fosforilase (ativa e total) da glândula submandibular de ratos diabéticos (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da estimulação com isoproterenol

Submandibular						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,021 ±0,002 a	0,013 ±0,008 a	0,035 ±0,005 a	0,031 ±0,019 a,b	0,6	0,86
T30	0,032 ±0,009 b	0,026 ±0,009 b	0,047 ±0,008 a	0,041 ±0,021 a	0,68	0,63
T60	0,025 ±0,004 a,b	0,027 ±0,005 b	0,047 ±0,006 a	0,042 ±0,008 a	0,53	0,64
T120	0,025 ±0,003 a,b	0,018 ±0,001 a	0,042 ±0,006 a	0,021 ±0,005 b *	0,59	0,85

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.24- Concentrações de proteína total (mg/g tecido) e de glicogênio (μg /mg tecido) em glândulas parótida (P) de ratos diabéticos (D) e controles (C) em jejum, após zero, 30,60 e 120 minutos da estimulação com isoproterenol

Parótida				
Tempo	Proteína		Glicogênio	
	mg proteína/g tecido		μg glicogênio/g tecido	
	C	D	C	D
T0	4,47 $\pm 0,84$ a	4,70 $\pm 1,30$ a	0,34 $\pm 0,05$ a	0,86 $\pm 0,25$ a *
T30	3,95 $\pm 0,19$ a	5,13 $\pm 1,54$ a	0,37 $\pm 0,14$ a	0,43 $\pm 0,09$ b
T60	4,71 $\pm 0,84$ a	4,09 $\pm 0,37$ a	0,46 $\pm 0,07$ a	0,44 $\pm 0,10$ b
T120	4,80 $\pm 0,67$ a	5,08 $\pm 0,65$ a	1,26 $\pm 0,39$ b	1,28 $\pm 0,29$ c

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA e teste de Tukey, $p > 0,05$;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.25- Atividades das formas ativa e total da glicogênio sintase nas glândulas parótidas de ratos diabéticos (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da estimulação pela isoproterenol

Parótida						
Tempo	GS ativa		GS total		GS ativa/GS total	
	mU/mg proteína		mU/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	5,17 ±1,26 a	9,67 ±3,53 a *	8,83 ±2,99 a	13,49 ±5,72 a,b	0,58	0,72
T30	8,88 ±2,03 b,c	5,57 ±1,01 b *	23,96 ±7,31 b	9,91 ±2,34 a *	0,37	0,56
T60	6,57 ±0,98 a,b	6,26 ±1,36 b	8,21 ±1,77 a	16,55 ±3,62 a,b	0,80	0,38
T120	10,12 ±3,16 c	7,59 ±2,96 a,b	22,33 ±16,63 b	22,52 ±5,72 b	0,45	0,33

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

Tabela 5.26- Atividades das formas ativa e total da glicogênio fosforilase nas glândulas parótidas de ratos diabéticos (D) e controle (C) em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da estimulação pelo isoproterenol

Parótida						
Tempo	GP ativa		GP total		GP ativa/GP total	
	U/mg proteína		U/mg proteína			
	C	D	C	D	C	D
T0	0,045 ±0,011 a	0,025 ±0,009 a,c *	0,053 ±0,017 a	0,034 ±0,012 a *	0,85	0,73
T30	0,008 ±0,001 b	0,011 ±0,001 b	0,011 ±0,002 b	0,014 ±0,001 b	0,73	0,78
T60	0,009 ±0,002 b	0,014 ±0,003 b,c	0,018 ±0,001 b	0,018 ±0,003 b	0,50	0,78
T120	0,006 ±0,001 b	0,018 ±0,001 c *	0,010 ±0,003 b	0,021 ±0,005 b	0,60	0,86

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA e teste de Tukey, p>0,05;

Letras diferentes significam diferença estatística na mesma coluna;

*Significa diferença entre controle e diabético no mesmo tempo.

6 DISCUSSÃO

O diabetes melito é uma doença caracterizada pela hiperglicemia crônica causada pela falta da secreção de insulina ou uma redução da ação da insulina ou ambas. Os sintomas clássicos do diabetes incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, às vezes polifagia e visão embaçada (KUZUYA et al., 2002), em nosso estudo os ratos diabéticos perderam peso, ingeriram mais líquido (polidipsia) e alimento (polifagia). A polifagia em ratos já foi relatada por outros autores (BARBERA et al., 2001; BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; GIRON et al., 2003), porém outros não observaram polifagia entre os animais diabéticos (ANDERSON et al., 1993; BARBERA et al., 1997; NICOLAU et al., 2005). A glicemia inicial e final dos animais diabéticos que participaram desse estudo foi acima de 250mg/dl de sangue e a glicemia final mostrou que os grupos alimentados, controle e diabético, apresentam glicemia superior aos grupos em jejum.

A dificuldade de a glicose ser transportada para dentro da célula prejudica o anabolismo e favorece o catabolismo, desta forma é comum os portadores de diabetes perderem peso corporal, assim como a redução de peso dos tecidos periféricos como as glândulas salivares (ANDERSON, 1983; ANDERSON et al., 1993; ANDERSON et al., 1989; MAHAY et al., 2004). Nossos resultados mostraram que tanto a glândula SM quanto a P apresentaram redução de peso absoluto e aumento no peso glandular relativo nos ratos diabéticos. A redução do peso absoluto do grupo diabético em relação ao controle é influenciada pelo peso corporal, pois o grupo controle apresenta um ganho de peso, assim como as glândulas salivares também, já o grupo diabético não apresenta o ganho de peso corporal e um pequeno ganho de peso glandular que fica mais claro analisando o

peso relativo que mostra o aumento nas glândulas SM e P quando relacionados com o peso corporal. High, Sutton e Hopper (1985) não encontrou hipertrofia na glândula SM e sim uma relação do peso glandular e o peso corpóreo maior que foi evidenciada pelo peso corpóreo reduzido nos diabéticos, assim como em nosso estudo (HIGH; SUTTON; HOPPER, 1985). A literatura mostra que nos ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina o peso da glândula SM diminui, a porcentagem do volume e a área de células acinares aumentam e o diâmetro e a porcentagem do volume dos ductos granulares aumentam (ANDERSON; SULEIMAN; GARRETT, 1994) e ocorre um acúmulo de lipídeos no parênquima glandular das três glândulas salivares maiores e é observado em maior intensidade na glândula parótida (ANDERSON, 1986; ANDERSON; SULEIMAN; GARRETT, 1994; HAND; WEISS, 1984; MAHAY et al., 2004).

A insulina tem efeitos diretos na síntese de proteínas das glândulas salivares. Na glândula SM tanto a insulina como o isoproterenol foram capazes de aumentar a síntese protéica sendo que o AMPc e o Ca^{+2} foram importantes moduladores deste processo (ANDERSON, 1988). A pilocarpina aumentou a síntese protéica na glândula parótida e diminuiu na submandibular (KUIJPER-LENSTRA; KRAMER, 1975; KUIJPER-LENSTRA; KRAMER; VAN VENROOIJ, 1975). Na glândula P a amilase é a proteína secretada em maior quantidade, em ratos diabéticos tanto a concentração de amilase quanto a síntese de RNAm estão reduzidas (KIM et al., 1990; SZCZEPANSKI; MEDNIEKS; HAND, 1998), embora outros autores não tenham encontrado alteração na concentração de amilase em rato diabéticos (NEWRICK et al., 1991). As proteínas não são afetadas da mesma forma pela insulina e nem pelo diabetes, além disso, a insulina pode interferir na síntese, na secreção das proteínas e na atividade das enzimas de maneira diferente. Nossos

resultados mostraram que tanto o estímulo pelo IPR e pela pilocarpina quanto o diabetes não alteraram a concentração de proteína total nas glândulas SM e P. Porém, quando comparamos os grupos alimentados com jejum observamos que as glândulas SM e P dos animais controles e diabéticos em jejum apresentaram um aumento de proteína total. A mastigação estimula a exocitose de proteínas (HECTOR; LINDEN, 1987) o que pode ser uma justificativa para encontrarmos menor concentração de proteína nos animais alimentados, considerando que os ratos têm hábitos noturnos (SUCKOW; WEISBROTH; FANKLIN, 2006) e a restrição alimentar do grupo jejum foi durante este período. Entretanto outros estudos observaram que após 48 horas de jejum a concentração de proteína total da glândula submandibular diminuiu (LEAL; PEDROSO; NICOLAU, 1980) e não alterou a habilidade de polirribossomos de sintetizar proteínas desta glândula (MENAKER; MILLER, 1973).

O conteúdo de glicogênio inicial dos animais diabéticos foi maior que o dos animais controle em ambas as glândulas estudadas. O acúmulo de glicogênio nas glândulas salivares SM e P de ratos diabéticos já foi descrito em animais dois meses após a indução do diabetes, em jejum e que foram sacrificados durante o período da tarde. A glândula SM apresentou um aumento de 22% e a glândula P de 225% e um aumento da atividade da glicogênio sintase e diminuição da atividade da glicogênio fosforilase (NICOLAU et al., 2005). Em nosso estudo, nos quatro experimentos diferentes (animais alimentados e injetados com IPR, animais alimentados e injetados com pilocarpina, animais em jejum e injetados com IPR e animais em jejum e injetados com pilocarpina) ocorreu acúmulo entre 50% e 70% na glândula SM e na P de 51% até 250% corroborando com a hipótese de que os animais diabéticos

podem apresentar maior concentração de glicogênio e que o aumento na parótida tende a ser maior que na SM.

A enzima hexoquinase é responsável pela primeira fosforilação da glicose após ela ter sido transportada para dentro das células, assim a glicose-6P poderá seguir a glicólise ou a glicogenogênese dependendo da demanda energética da célula. Em ratos diabéticos a atividade da hexoquinase, solúvel e ligada à mitocôndria, foi menor na SM e maior na P (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005) o que sugere maior disponibilidade de glicose-6P na glândula parótida e conseqüentemente maior possibilidade de a via da glicogenogênese ser utilizada e, portanto favorecer o acúmulo de glicogênio nesse tecido como o encontrado neste trabalho.

O aumento de glicogênio em animais diabéticos também já foi relatado em outros tecidos como o rim (KANG et al., 2005; NANNIPIERI et al., 2001), pâncreas (MALAISSE et al., 2001) e retina (HORI, 1980; SÁNCHEZ-CHÁVEZ et al., 2008).

O processo de secreção salivar é estimulado pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. A estimulação simpática das glândulas salivares apresenta as seguintes características: é mediada principalmente pelo neurotransmissor noradrenalina que age essencialmente nas células que estão recebendo o impulso parassimpático o que tende a produzir um efeito sinérgico; geralmente não causa muita mobilização de fluído; tende a modular a composição de saliva pelo aumento da exocitose nas células das glândulas salivares; induz a contração das células mioepiteliais. A estimulação parassimpática apresenta características diferentes das citadas acima, e descritas a seguir: é mediada principalmente pela acetilcolina em combinação com transmissores não adrenérgicos, não colinérgicos (NANC), como por exemplo, o peptídeo vasointestinal

(VIP); provoca maior parte da secreção fluída da saliva, principalmente agindo pelo receptor colinérgico muscarínico M3 e em menor extensão pelo M1; causa níveis variáveis de exocitose nas células das glândulas salivares, mas é responsável pela maior secreção de mucina nas células mucosas; induz a contração das células mioepiteliais (PROCTOR; CARPENTER, 2007).

O fluxo e a composição da saliva estimulada são diferentes nas três glândulas salivares maiores, SM, P e SL, e também entre a mesma glândula se comparados a diferentes espécies. O estímulo nervoso simpático causa a exocitose nos ácinos e nas células do ducto granular em submandibular de ratos (GARRETT et al., 1991), assim como na glândula parótida (GARRETT; THULIN, 1975). O estímulo nervoso parassimpático secreta principalmente água e cerca de 8% da quantidade de proteína secretada pelo estímulo simpático (GARRETT et al., 1991).

Os ratos quando estimulados diretamente no nervo também induz a secreção de saliva em ambas as glândulas, SM e P. Porém se o estímulo é simpático ocorre menor degranulação nos ácinos e nos ductos granulares dos ratos diabéticos quando comparado aos controles e se o estímulo for parassimpático ocorre à extrusão no grânulo de secreção na glândula SM sem diferença entre os animais diabéticos e controles (ANDERSON; GARRETT; PROCTOR, 1990; ANDERSON et al., 1993)

A neuropatia é uma complicação comum no diabetes melito e como consequência pode-se observar uma redução do transporte, da síntese e da liberação de neurotransmissores e uma redução na velocidade da condução nervosa. Em ratos após seis meses da indução do diabetes foram observadas alterações na concentração de norepinefrina e na atividade das enzimas

colinérgicas, acetilcolinesterase e colina acetiltransferase, nas glândulas SM e P (ANDERSON; GARRETT, 1994).

A pilocarpina é um agonista muscarínico e, portanto capaz de promover a secreção de fluído por meio da ativação de canais de Ca^{+2} , K^{+} e Cl^{-} e aumenta a expressão de aquaporina 5, permitindo a passagem de água do ácino para o lúmen e também a exocitose de pequena quantidade de proteína (LI et al., 2006). Em glândulas SM de ratos a pilocarpina induz a liberação de mucina ativando os receptores M1e M4, aumentando o nível de cálcio intracelular e de AMPc que resulta na exocitose de proteínas pela ativação da ciclooxigenase (COX), óxido nítrico sintase (NOX) e proteína quinase C (PKC). A ativação da COX libera a protaglandina E_2 (PGE_2) que estimula o acúmulo de AMPc, o produto da reação decorrente da ativação da óxido nítrico sintase (NOS), o óxido nítrico (NO) está envolvido com a capacidade do Ca^{+2} entrar na célula e a ativação da PKC juntamente com o AMPc e o cálcio intracelular estão diretamente envolvidos no processo da exocitose (BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2006).

O IPR é um agonista adrenérgico que apresenta estrutura semelhante à adrenalina. O tratamento crônico com o IPR causa sialoadenose nas glândulas salivares, ou seja, um aumento do peso e do volume glandular decorrentes de alterações metabólicas e secretoras e não-inflamatórias, sendo que este processo é dependente da dose administrada e da duração do experimento. Em nosso estudo foi utilizada dose única de isoproterenol com o objetivo apenas de estimular o processo de secreção salivar. O IPR pode interagir com os receptores $\alpha 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos, porém em doses baixas ele é capaz de estimular apenas o receptor $\beta 2$ adrenérgico, o que foi proposto no protocolo deste trabalho (uma dose baixa de 5mg/kg p.c.).

O agonista IPR apresenta alguns efeitos no metabolismo de carboidratos da glândula SM, no decorrer de 36 horas após sua administração foi observado aumento da via glicolítica, aumento da concentração de piruvato e fosfoenolpiruvato, porém não de lactato e de citrato, mostrando que o piruvato não está sendo utilizado na via anaeróbica e nem no ciclo de Krebs, mas ocorreu um aumento de ácido graxo e ácido siálico que são compostos derivados do PEP (NICOLAU; SASSAKI, 1982) e também foi observado que a via das pentoses tem uma atividade predominante a da via glicolítica até 20hs após a administração do agonista, o que sugere um período de síntese de nucleotídeos e divisão celular (SASSAKI; NICOLAU, 1982).

O estímulo das glândulas SM e P com pilocarpina aumentou a atividade da PFK-1 em ambas as glândulas após 30 minutos, sendo que esta enzima tem um papel regulador na via glicolítica, pode-se concluir que o estímulo com a pilocarpina ativa a glicólise na SM e P e também degradou glicogênio na glândula SM após 30 minutos do estímulo. Tanto a atividade da PFK-1 quanto o conteúdo de glicogênio tendem a voltar ao nível inicial após 120 minutos do estímulo (NICOLAU; DE SOUZA; MARTINS, 1992).

A degradação de glicogênio já foi descrita em células do ducto granular da glândula SM após estímulo parassimpático com o agonista ciclotidina (THOMOPOULOS; GARRETT; PROCTOR, 2002; THOMOPOULOS et al., 1996), após estímulo do nervo simpático (GARRETT et al., 1994) e após a estimulação com norepinefrina e carbacol (ROSSIGNOL, 1974). No ducto estriado de glândulas SL o estímulo do nervo simpático causou perda de glicogênio enquanto o estímulo parassimpático não mostrou diferença (GARRETT; ANDERSON, 1991a).

Nossos resultados mostraram que com 30 minutos de experimento ocorreu glicogenólise na glândula SM após estímulo com pilocarpina nos grupos de ratos

controles e diabéticos alimentados e em jejum, e quando o estímulo foi com o IPR apenas no grupo controle alimentado não ocorreu degradação de glicogênio. Na glândula P os animais diabéticos em jejum degradaram glicogênio com ambos os estímulos, e no grupo alimentado apenas o grupo diabético estimulado com o IPR apresentou glicogenólise. Após duas horas de experimento todos os grupos controles que haviam alterado o conteúdo de glicogênio alcançaram valores similares ao inicial, mas na SM dos ratos diabéticos nenhum grupo alcançou valores iniciais e na parótida apenas o grupo diabético alimentado estimulado com IPR não conseguiu valor semelhante ao inicial. Nos grupos diabéticos a porcentagem de degradação de glicogênio foi maior que quando comparada a dos seus respectivos grupos controles o que pode justificar animais diabéticos não conseguiram recuperar os valores iniciais de glicogênio e não por apresentarem a síntese de glicogênio prejudicada.

A glândula parótida dos animais controles não degradou glicogênio em nenhum dos grupos estudados ao contrário da glândula SM. A glândula P apresenta o metabolismo predominantemente aeróbico, enquanto que a SM é predominantemente anaeróbica (NICOLAU; SASSAKI, 1976), portanto a parótida realiza a quebra completa da molécula de glicose por meio da via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia respiratória desta forma obtendo maior quantidade de ATP a partir de uma molécula de glicose, ao contrário da submandibular que utiliza a via glicolítica e a fermentação do piruvato em lactato, assim obtendo um saldo final de ATP menor que no metabolismo aeróbico. Como o estímulo simpático e parassimpático promove a secreção de saliva e sendo este processo dependente de energia, a necessidade da SM utilizar glicose e conseqüentemente mobilizar glicogênio pode ser maior que a da P para atender a demanda energética deste processo.

Animais diabéticos quando estimulados com pilocarpina e isoproterenol apresentaram fluxo salivar total menor que os controles, porém quando estimulados com noradrenalina e felinefrina não houve alteração no fluxo salivar (KIMURA et al., 1996; MURAI et al., 1996; WATANABE; YAMAGISHI-WANG; KAWAGUCHI, 2001). Apesar de alguns estudos relatarem o fluxo salivar menor em diabéticos estimulados com pilocarpina e isoproterenol, nossos resultados mostram maior ou igual degradação de glicogênio nos ratos diabéticos nas glândulas SM e P quando estimuladas com o isoproterenol e com a pilocarpina se comparado com seus respectivos grupos controles. Embora o IPR atue aumentando a concentração de AMPc e este segundo mensageiro estar envolvido diretamente na estimulação da glicogenólise podemos analisar também que o fluxo salivar estimulado é menor nos animais diabéticos e a degradação de glicogênio deveria ser menor se esses parâmetros tivessem uma relação direta, porém os ratos diabéticos podem necessitar de uma quantidade de glicose maior para secretar menor quantidade de saliva. A mobilização de glicogênio produz glicose, esta é degradada para formar ATP e ser utilizado no processo secretório de saliva, porém se os ratos diabéticos necessitam de mais glicose para secretar saliva podemos sugerir que a glicose pode estar sendo utilizada em outras vias metabólicas como, por exemplo, a utilização da glicose para a síntese de glicerol a partir da diidroxiacetona-fosfato formada na via glicolítica e conseqüentemente favorecendo o acúmulo de lipídeos o que já foi relatado nas glândulas salivares anteriormente e discutido acima. Hand e Weiss (1984) propuseram que o acúmulo de lipídeo na parótida pode ocorrer em parte devido à redução de sua utilização como fonte de energia necessária para a exocitose de proteínas, e para tanto a energia necessária deve ser originada da glicose. Ao contrário da glândula salivar, em músculo esquelético de ratos diabéticos

foi observado que o conteúdo de glicogênio é menor e ocorre acúmulo de lipídeo, desta forma a oxidação de ácidos graxos foi maior que a de carboidratos (STEARNS; TEPPERMAN; TEPPERMAN, 1979)

As enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase são as principais enzimas regulatórias no processo de glicogenogênese e glicogenólise, respectivamente. O metabolismo de glicogênio está sujeito ao controle alostérico, no qual o efetor alostérico se liga à enzima e rearranja sua conformação convertendo-a num melhor substrato para ela ser ativada ou inativada, por proteínas quinases ou fosfatases, por meio de fosforilações ou desfosforilações, ou seja, o controle por modificação covalente. Desta forma temos a glicogênio fosforilase ativa (a), fosforilada e a inativa (b), desfosforilada.

A glicogênio fosforilase é regulada alostericamente pelo AMP que causa sua ativação e pelo ATP e glicose que a inibem. Quando um receptor β -adrenérgico é estimulado ele ativa a adenilil ciclase e aumenta a concentração de AMPc então a enzima PKA é ativada e causa a fosforilação da fosforilase quinase. A fosforilase quinase muscular apresenta quatro subunidades (α , β , γ e δ) A PKA fosforila os resíduos de serina das subunidades α e β e a subunidade β se liga a quatro Ca^{2+} , pois ela apresenta uma proteína ligante idêntica à calmodulina e esta ligação do cálcio na subunidade β é capaz de ativar a subunidade γ , enquanto a molécula permanece desfosforilada. Assim a fosforilase quinase por sua vez fosforila a glicogênio fosforilase levando desta forma à glicogenólise. O complexo cálcio/calmodulina também atua no controle da fosforilase quinase no músculo, promovendo a ativação máxima da glicogênio fosforilase, pois ele passa a ativar tanto a glicogênio fosforilase ativa (a) quanto a inativa (b). A fosfoproteína fosfatase é a responsável pela desfosforilação da glicogênio fosforilase, que ocorre quando a

concentração de AMPc diminui pela ação da insulina, assim desativando-a (DEVLIN, 1998)

A enzima glicogênio sintase é ativada alostericamente pela glicose-6P e apresenta a forma dependente de Glicose-6P (b) e independente de Glicose-6P (a). Além da regulação alostérica existem vários segundos mensageiros capazes de catalisar a fosforilação desta enzima assim inativando-a, dentre eles o AMPc, Ca^{2+} , DAG, dentre outros. Esta enzima pode ser fosforilada em nove resíduos de serina diferentes, portanto já foram identificadas onze proteínas quinases diferentes capazes de fosforilar e inativar a GS. O AMPc é um 2º. mensageiro que inibe a GS e ativa a GP, tendo um papel importante na regulação da síntese e degradação do glicogênio. O Ca^{2+} também atua em ambas as enzimas por meio de proteínas quinases independente do AMPc. A via da enzima PKC, Ca^{2+} /Calmodulina e fosfolípidos como o DAG atuam fosforilando apenas a glicogênio sintase e não a glicogênio fosforilase. Existem outras enzimas que fosforilam a glicogênio sintase independentemente de Ca^{2+} e AMPc como a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), a caseína quinase I e III, essas enzimas estão sujeitas a regulação hormonal (DEVLIN, 1998).

A glicogênio sintase é ativada pela desfosforilação por meio da enzima fosfoproteína fosfatase, capaz de remover o fosfato dos resíduos de serina. A fosfoproteína fosfatase no músculo é regulada pela concentração de glicogênio e pela subunidade G que quando associados a esta enzima torna a ação da fosfoproteína fosfatase sobre a glicogênio sintase 10 vezes maior, a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) causa fosforilação da subunidade G e a libera da fosfoproteína fosfatase assim deixando-a menos ativa. Outra proteína chamada Inibidor 1 é capaz de se ligar a uma subunidade catalítica da fosfoproteína fosfatase,

causando sua inibição e também o Inibidor 1 será ativado somente após a fosforilação pela PKA, assim o AMPc novamente tem um papel importante na inibição da fosfoproteína fosfatase e conseqüentemente da glicogênio sintase (DEVLIN, 1998).

Nas glândulas salivares quando o processo de secreção salivar é estimulado via estímulo β -adrenérgico ou pelo peptídeo vaso intestinal ocorre o aumento de AMPc no ácino e quando o estímulo é muscarínico, α -adrenérgico ou pelo receptor da substância P ocorre a ativação da fosfolipase C que hidrolisa o PIP_2 em DAG e IP_3 que causam a ativação da PKC e aumento de cálcio intracelular (BAUM, 1993). Portanto os segundos mensageiros envolvidos na secreção de saliva também estão envolvidos na ativação da glicogênio fosforilase e inativação da glicogênio sintase.

Nas condições experimentais deste estudo as enzimas glicogênio fosforilase e glicogênio sintase não apresentaram um padrão entre os grupos estudados. O acúmulo de glicogênio inicial nos ratos diabéticos não se mostrou acompanhado do aumento da glicogênio sintase e redução da glicogênio fosforilase como já descrito por Nicolau et al. (2005). Após 30 minutos do estímulo com o isoproterenol e a pilocarpina a maioria dos grupos apresentou redução no conteúdo de glicogênio, porém nem sempre encontramos aos 30 minutos a maior atividade da glicogênio fosforilase. O metabolismo de glicogênio permite uma grande amplificação do sinal, pois a partir de uma molécula de AMPc ocorre a ativação de uma enzima PKA que poderá ativar muitas enzimas fosforilase quinase que estimula uma quantidade maior ainda de enzimas glicogênio fosforilase, assim amplificando o sinal rapidamente e permitindo a mobilização de glicogênio em poucos minutos, o que pode ter ocorrido em nosso estudo é que a glicogênio fosforilase pode ter tido um pico de atividade anterior aos 30 minutos refletindo a pequena concentração de

glicogênio encontrada no grupos T30. Ao final de duas horas de experimento nos grupos que ocorreu a degradação de glicogênio encontra-se em alguns grupos uma relação da forma ativa e total da glicogênio sintase alta nos grupos T60 e T120, favorecendo a síntese do glicogênio.

Em alguns músculos em condições anaeróbicas ocorre importante conversão da glicogênio fosforilase inativa em ativa e da glicogênio sintase ativa em inativa possivelmente por controle alostérico. Os baixos níveis de ATP causam inibição da fosforilase; os níveis de glicose-6P caem e a glicogênio sintase fica menos ativa; os níveis de AMP sobem e ativam a fosforilase, assim o músculo pode obter ATP pela via glicolítica a partir da glicose-6P obtida pela glicogenólise (DEVLIN, 1998). A glândula SM apresenta um metabolismo preferencialmente anaeróbico e nos ratos controles o consumo de glicogênio ocorreu na SM e não na glândula parótida como já discutido anteriormente. Porém a glândula SM não apresentou maior atividade da glicogênio fosforilase, e a relação da forma ativa e total revelou que a glândula P apresenta valores maiores em muitos grupos estudados se comparada a SM nas mesmas condições experimentais.

O metabolismo de glicogênio no fígado e nos músculos tem um papel importante para o organismo. O fígado é o órgão responsável por manter a glicemia estável, nos períodos pós-prandiais o fígado é capaz de transportar grande quantidade de glicose para o seu interior e estocá-la na forma de glicogênio sendo que até 10% do peso total do fígado pode ser atribuído ao seu conteúdo de glicogênio

O músculo esquelético estoca a maior parte da glicose sanguínea em períodos pós-prandiais, devido ao estímulo da insulina mediar a translocação dos transportadores de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática e permitir a

entrada da glicose para dentro da célula e então ser convertida em glicogênio. Nos períodos de jejum e de intenso exercício do músculo o glicogênio é degradado. Durante o exercício ocorre a hidrólise de ATP e aumenta os níveis de ADP e Pi que estimula a via glicolítica a produzir mais ATP e a glicogênio fosforilase é ativada alostericamente pelo Pi e pelo cálcio liberado na contração muscular, assim o glicogênio é mobilizado (GREENBERG et al., 2006).

O metabolismo de glicogênio do músculo e do fígado apresenta diferenças que estão relacionadas à função de cada tecido no organismo. As enzimas do metabolismo de glicose e glicogênio apresentam isoformas tecido-específicas como, por exemplo, a glicogênio sintase e fosforilase. A regulação por modificação covalente é similar nos dois tecidos, o que difere é a regulação alostérica. As principais diferenças entre esses tecidos são: o transportador de glicose no fígado é o GLUT2, que tem baixa afinidade pela glicose e alta velocidade de transporte e no músculo é o GLUT4, que tem alta afinidade e baixa velocidade e depende da sinalização de insulina para se translocar de vesículas internas para a membrana plasmática; a enzima capaz de fosforilar a glicose assim que ela entra na célula no fígado é a HK IV (glicoquinase) e ela não é inibida pelo produto da reação que catalisa a glicose-6P, enquanto no músculo existem duas isoformas atuando nesta etapa, a HK I e II que são inibidas pela glicose-6P; a glicogênio sintase apresenta duas isoformas, a do fígado que parece ser tecido específica e a do músculo que já foi encontrada em outros tecidos, as diferenças entre as isoformas sugerem que a síntese de glicogênio seja controlada de forma distinta; a glicogênio fosforilase também apresenta duas isoformas e a do fígado é mais sensível ao controle por modificação covalente e não é ativada alostericamente pelo AMPc ao contrário do que ocorre no músculo (FERRER et al., 2003; GREENBERG et al., 2006).

No fígado de ratos o diabetes experimental induzido pela STZ há três meses prejudicou a capacidade do fígado sintetizar glicogênio, que foi acompanhada pela redução na porcentagem da enzima glicogênio sintase na forma ativa. Outros metabólitos que estão correlacionados com o metabolismo de glicogênio neste tecido que se apresentaram alterados foram, o baixo nível de UDPG, a baixa concentração de F-2,6-P₂ e alto nível de AMPc. O conteúdo de glicogênio dos ratos diabéticos há nove meses mostrou-se normal nos animais alimentados e maior nos animais em jejum por 24 horas, esses resultados podem estar relacionados à melhora na ativação da glicogênio sintase e ao aumento da gliconeogênese como fonte de glicose para a formação de glicogênio (FERRANNINI et al., 1990). Em hepatócitos de ratos também foi relatado redução do conteúdo de glicogênio e menor atividade da glicogênio sintase atribuída a defeitos em sua regulação e não a falhas na síntese da enzima (LIBAL-WEKSLER et al., 2001).

Em contrapartida, outro estudo com hepatócitos de ratos mostrou menor conteúdo de glicogênio em animais diabéticos alimentados e em jejum e a enzima glicogênio sintase ativa menor em animais alimentados quando comparados aos em jejum nos ratos controles, diabéticos há três e oito dias. A GS total foi maior nos animais diabéticos alimentados e em jejum. A enzima glicogênio fosforilase ativa foi maior nos animais alimentados comparados com os em jejum e menor nos animais diabéticos. A glicogênio fosforilase total não foi diferente nos animais diabéticos alimentados e em jejum (GANNON; NUTTALL, 1997).

No músculo o metabolismo de glicogênio se comporta de modo diferente conforme o tipo de tecido (fibras brancas, fibras vermelhas, gastrocnemius ou soleus) e também depende da intensidade do exercício solicitado. Em ratos em jejum foi descrito um pequeno aumento de glicogênio nos diabéticos (FERREIRA et

al., 2001) enquanto que em ratos diabéticos alimentados nenhuma diferença foi encontrada (ARMSTRONG; IANUZZO, 1977).

Em nosso estudo quando comparamos o metabolismo de glicogênio dos animais alimentados e jejum podemos perceber um padrão semelhante na resposta aos agonistas pilocarpina e isoproterenol nas glândulas SM e P, e a análise estatística ANOVA revelou que os valores da concentração de glicogênio, da atividade das enzimas glicogênio fosforilase e sintase (ativa e total) foram estatisticamente diferentes em alguns grupos estudados. O glicogênio inicial apresentou-se maior nos ratos alimentados quando comparados com os ratos em jejum nas glândulas SM e P. O estímulo com a pilocarpina causou a degradação de glicogênio na SM dos ratos C e D alimentados e em jejum e na P apenas o grupo D em jejum consumiu glicogênio. O estímulo com IPR na SM degradou glicogênio nos grupos C e D em jejum e na P os grupos C alimentado e jejum não diminuíram o conteúdo de glicogênio.

Fatias de glândula SM de ratos submetidos a vários períodos de jejum foram incubadas sem substrato e não apresentaram variação no consumo de oxigênio, porém uma maior produção de ácido láctico e diminuição do conteúdo de glicogênio (PEDROSO et al., 1976). E outro estudo com SM de ratos privados de alimento por vários períodos entre 24-120 horas apresentaram diminuição da concentração de proteína total, nenhuma variação na atividade da hexoquinase, a PFK-1 diminuiu sua atividade e a piruvato quinase não variou sua atividade específica. A relação da atividade PFK-1/G6PD diminuiu em alguns períodos de jejum indicando um potencial maior para a utilização da glicose na via das pentoses do que na via glicolítica (LEAL; PEDROSO; NICOLAU, 1980). Nosso estudo corrobora com os resultados em que os animais em jejum apresentam menor conteúdo de glicogênio e também

mostra que a relação da atividade (ativa/total) da enzima glicogênio sintase foi mais susceptível a alterações do jejum que a glicogênio fosforilase. Na SM dos ratos alimentados apenas o grupo D apresentou relação por volta de 70% em T0 e por volta de 20% nos outros tempos estudados nos estudos para ambos os estímulos, e nos animais em jejum se comparados aos alimentados a relação da atividade da GS foi maior em todos os grupos diabéticos. Na glândula P a relação da atividade da GS também mostrou diferenças entre os grupos C e D, porém a maior relação da atividade da GS dos ratos diabéticos em jejum foi mais evidente nos primeiros tempos estudados (T0 e T30).

Os resultados da atividade específica da glicogênio fosforilase ativa e total mostrou que as glândulas SM e P apresentaram menor atividade para as duas formas da enzima nos animais em jejum quando estimulados com pilocarpina, sendo que essa diferença ocorreu nos primeiros tempos T0 e T30 para a forma ativa e em todos os tempos para a forma total quando comparados aos alimentados. Já com o estímulo do IPR a SM apresentou menores valores para a formas ativa da GP no T0 para os animais controle e no T0 e T30 para os ratos diabéticos e na parótida apenas o grupo controle no T120 apresentou menores valores para a forma ativa e total da enzima. Neste caso podemos ver a influência do estado nutricional não apenas na atividade da glicogênio fosforilase como também alterações diferentes para cada tipo de estímulo, colinérgico ou adrenérgico. A atividade da GP após o estímulo com o isoproterenol foi menos influenciada pelo jejum em ambas as glândulas, parótida e SM. O IPR é um estímulo que atua aumentando o níveis de AMPc, importante modulador da síntese e degradação de glicogênio o que pode ter contribuído para que a GP fosse menos afetada pelo jejum quando comparada ao estímulo com pilocarpina.

O metabolismo de glicogênio do fígado e dos músculos apresenta diferenças na regulação da síntese e degradação de glicogênio, sendo que os transportadores de glicose (GLUTs) e as isoformas das enzimas envolvidas nesses processos são responsáveis pela especificidade de cada tecido como já discutido acima. A regulação do metabolismo de glicogênio das glândulas salivares SM e P ainda não é bem compreendida, sabe-se que a hexoquinase I e II atua em ambas as glândulas e que uma terceira isoforma da HK pode estar presente nessas glândulas (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005).

Herman e Rossignol (1975) concluíram que a epinefrina e o carbacol estimulam a glicogenólise na SM ativando a glicogênio fosforilase via receptores α e β adrenérgicos e pelo aumento de Ca^{++} intracelular e aumento dos níveis de AMPc e o estímulo colinérgico com carbacol não modificou os níveis de AMPc sendo portanto glicogenólise dependente apenas do Ca^{2+} . Portanto a ativação da glicogênio fosforilase na glândula SM é similar a existente no músculo.

O metabolismo de glicogênio apresentou alterações referentes ao diabetes e ao jejum, sendo que essas alterações foram diferentes conforme o estímulo, com pilocarpina ou isoproterenol e também conforme a glândula, parótida ou submandibular. Para melhor compreensão dessas alterações faz-se necessário mais estudos da regulação da síntese e degradação de glicogênio nas glândulas SM e parótida.

7 CONCLUSÕES

♦A doença diabetes e a aplicação dos agonistas, pilocarpina e isoproterenol, não alteraram a concentração de proteínas das glândulas submandibular e parótida. Já os ratos controles e diabéticos em jejum apresentaram maior concentração de proteína total nas glândulas submandibular e parótida quando comparados aos animais alimentados.

♦As glândulas submandibulares e parótidas dos animais diabéticos apresentaram acúmulo de glicogênio, sendo que a glândula parótida tende a acumular mais glicogênio que a submandibular.

♦O estímulo com agonistas, adrenérgico e colinérgico, degradou glicogênio nas glândulas submandibulares de ratos controles e diabéticos.

♦Na glândula parótida dos ratos controles não ocorreu a glicogenólise após o estímulo adrenérgico e colinérgico ao contrário da glândula P dos ratos diabéticos que mobilizaram glicogênio após 30 minutos de ambos os estímulos.

♦Após duas horas do estímulo adrenérgico e colinérgico os grupos controles que degradaram glicogênio já haviam recuperado o conteúdo inicial, porém os diabéticos ainda não.

♦Os grupos diabéticos degradaram uma porcentagem maior de glicogênio que o grupo controle.

♦Inicialmente os animais em jejum apresentaram menor conteúdo de glicogênio que os animais alimentados.

♦A relação da atividade da glicogênio sintase ativa e total foi maior na glândula SM dos animais em jejum quando comparados aos alimentados

independente do estímulo. A glândula P apresentou resultados semelhantes, porém apenas nos tempos iniciais (T0 e T30).

♦A atividade específica da GP ativa e total diminuiu nos animais em jejum e foi mais evidente com o estímulo da pilocarpina, pois afetou todos os tempos estudados na forma total da enzima em ambas as glândulas e com o estímulo do IPR a redução só ocorreu nos tempos iniciais e apenas na glândula SM.

REFERÊNCIAS¹

Alam SQ, Alam BS. Effect of isoprenaline on salivary gland lipids of rats fed a choline-deficient diet. *J Dent Res* 1978;57(4):643-9.

Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am J Physiol* 1983;245(3):G431-7.

Anderson LC. Insulin-stimulated protein synthesis in submandibular acinar cells: interactions with adrenergic and cholinergic agonists. *Horm Metab Res* 1988;20(1):20-3.

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

Anderson LC, Garrett JR. The effects of streptozotocin-induced diabetes on norepinephrine and cholinergic enzyme activities in rat parotid and submandibular glands. *Arch Oral Biol* 1994;39(2):91-7.

Anderson LC, Garrett JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Arch Oral Biol* 2004;49(3):183-91.

Anderson LC, Garrett JR, Proctor GB. Morphological effects of sympathetic nerve stimulation on rat parotid glands 3-4 weeks after the induction of streptozotocin diabetes. *Arch Oral Biol* 1990;35(10):829-38.

Anderson LC, Garrett JR, Suleiman AH, Proctor GB, Chan KM, Hartley R. In vivo secretory responses of submandibular glands in streptozotocin-diabetic rats to sympathetic and parasympathetic nerve stimulation. *Cell Tissue Res* 1993;274(3):559-66.

Anderson LC, Garrett JR, Thulin A, Proctor GB. Effects of streptozotocin-induced diabetes on sympathetic and parasympathetic stimulation of parotid salivary gland function in rats. *Diabetes* 1989;38(11):1381-9.

De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE

Anderson LC, Shapiro BL. The effect of alloxan diabetes and insulin in vivo on peroxidase activity in the rat submandibular gland. *Arch Oral Biol* 1979;24(5):343-5.

Anderson LC, Shapiro BL. The effect of alloxan diabetes and insulin on the rate of protein synthesis in the rat submandibular gland. *Horm Metab Res* 1980;12(2):47-50.

Anderson LC, Suleiman AH, Garrett JR. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. *Microsc Res Tech* 1994;27(1):61-70.

Anrep GV, Cannan RK. The metabolism of the salivary glands: II. The blood sugar metabolism of the submaxillary gland. *J Physiol* 1922;56(3-4):248-58.

Armstrong RB, Ianuzzo CD. Exercise-induced muscle glycogen depletion and repletion in diabetic rats. *Life Sci* 1977;20(2):301-8.

Barbera A, Fernandez-Alvarez J, Truc A, Gomis R, Guinovart JJ. Effects of tungstate in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats: mechanism leading to normalization of glycaemia. *Diabetologia* 1997;40(2):143-9.

Barbera A, Gomis RR, Prats N, Rodriguez-Gil JE, Domingo M, Gomis R, et al. Tungstate is an effective antidiabetic agent in streptozotocin-induced diabetic rats: a long-term study. *Diabetologia* 2001;44(4):507-13.

Barbera A, Rodriguez-Gil JE, Guinovart JJ. Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem* 1994;269(31):20047-53.

Baum BJ. Principles of saliva secretion. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:17-23.

Baum BJ, Colpo FT, Filburn CR. Characterization and relationship to exocrine secretion of rat parotid gland cyclic AMP-dependent protein kinase. *Arch Oral Biol* 1981;26(4):333-7.

Baum BJ, Freiberg JM, Ito H, Roth GS, Filburn CR. beta-Adrenergic regulation of protein phosphorylation and its relationship to exocrine secretion in dispersed rat parotid gland acinar cells. *J Biol Chem* 1981;256(18):9731-6.

Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 1981;50:385-432.

Busch L, Sterin-Borda L, Borda E. An overview of autonomic regulation of parotid gland activity: influence of orchiectomy. *Cells Tissues Organs* 2006;182(3-4):117-28.

Chiang PK. Glycogen metabolism in the snail, *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol B* 1977;58(1):9-12.

Darnell JA, Saunders MJ. Oral manifestations of the diabetic patient. *Tex Dent J* 1990;107(2):23-7.

Deutsch W, Raper HS. The respiration and metabolism of submaxillary gland tissue of the cat. *J Physiol* 1938;92(4):439-58.

Devlin TM. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. 4a. ed. São Paulo: Editora Edgarg Blucher Ltda; 1998.

Dodds MW, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83(4):465-70.

Fava-de-Moraes F, Nicolau J. Glycogen concentration in isoproterenol-stimulated salivary glands of mice. *Experientia* 1975;31(9):1010-11.

Ferrannini E, Lanfranchi A, Rohner-Jeanrenaud F, Manfredini G, Van de Werve G. Influence of long-term diabetes on liver glycogen metabolism in the rat. *Metabolism* 1990;39(10):1082-8.

Ferreira LD, Brau L, Nikolovski S, Raja G, Palmer TN, Fournier PA. Effect of streptozotocin-induced diabetes on glycogen resynthesis in fasted rats post-high-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(1):E83-91.

Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernandez-Novell JM, Garcia-Rocha M, de la Iglesia N, et al. Control of glycogen deposition. *FEBS Lett* 2003;546(1):127-32.

Fiske C, Subarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375.

Gannon MC, Nuttall FQ. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen synthase activity, protein, and mRNA in rats. *Diabetologia* 1997;40(7):758-63.

Garrett JR, Anderson LC. Rat sublingual salivary glands: secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. *Arch Oral Biol* 1991;36(9):675-83.

Garrett JR, Anderson LC. Rat sublingual salivary glands: secretory changes on parasympathetic or sympathetic nerve stimulation and a reappraisal of the adrenergic innervation of striated ducts. *Arch Oral Biol* 1991a;36(9):675-83.

Garrett JR, Suleiman AM, Anderson LC, Proctor GB. Secretory responses in granular ducts and acini of submandibular glands in vivo to parasympathetic or sympathetic nerve stimulation in rats. *Cell Tissue Res* 1991b;264(1):117-26.

Garrett JR, Kidd A. Effects of nerve stimulation and denervation on secretory material in submandibular striated duct cells of cats, and the possible role of these cells in the secretion of salivary kallikrein. *Cell Tissue Res* 1975;161(1):71-84.

Garrett JR, Thomopoulos GN, Zhang XS, Hartley R. The fate of glycogen in granular tubule cells of rat submandibular glands during secretory events. *Arch Oral Biol* 1994;39(5):449-52.

Garrett JR, Thulin A. Changes in parotid acinar cells accompanying salivary secretion in rats on sympathetic or parasympathetic nerve stimulation. *Cell Tissue Res* 1975;159(2):179-93.

Giglio MJ, Lama MA. Effect of experimental diabetes on mandible growth in rats. *Eur J Oral Sci* 2001;109(3):193-7.

Giron MD, Caballero JJ, Vargas AM, Suarez MD, Guinovart JJ, Salto R. Modulation of glucose transporters in rat diaphragm by sodium tungstate. *FEBS Lett* 2003;542(1-3):84-8.

Greenberg CC, Jurczak MJ, Danos AM, Brady MJ. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291(1):E1-8.

Gresik EW. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microsc Res Tech* 1994;27(1):1-24.

Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiologia Médica*; 9^aed, Rio de Janeiro: Ganabara Koogan 1997.

Hand AR, Weiss RE. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest* 1984;51(4):429-40.

Hector MP, Linden RW. The possible role of periodontal mechanoreceptors in the control of parotid secretion in man. *Q J Exp Physiol* 1987;72(3):285-301.

High AS, Sutton J, Hopper AH. A morphometric study of submandibular salivary gland changes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol* 1985;30(9):667-71.

Hoffman BB, Lefkowitz, RJ. Catecolaminas, drogas simpaticomiméticas e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: Gilman AG, *As bases farmacológicas da terapeutica*; 9^aed; Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A DE C.V.; 1996. p. 103-17.1996.

Hori SN, T. Mukai, N. Ultrastructural studies on lysosomes in retinal Muller cells of streptozotocin-diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(11):1295-300.

Hue L, Bontemps F, Hers H. The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations. *Biochem J* 1975;152(1):105-14.

Joan HB, Taylor, P. Agonistas e Antagonistas dos Receptores Muscarínicos. In: Gilman AG, *As bases farmacológicas da terapêutica*. 9^aed; Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A DE C.V.; 1996. p. 103-17.

Kang J, Dai XS, Yu TB, Wen B, Yang ZW. Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney. *Acta Diabetol* 2005;42(2):110-6.

Katchburian E, Aranã-Chaves V. *Histologia e embriologia: atlas, correlações clínicas*. 1a. ed.;Rio de Janeiro; Ganabara Koogan; 1999.

Kim SK, Cuzzort LM, McKean RK, Allen ED. Effects of diabetes and insulin on alpha-amylase messenger RNA levels in rat parotid glands. *J Dent Res* 1990;69(8):1500-4.

Kimura I, Miyamoto H, Chen F, Kimura M. The Streptozotocin-Diabetic State Depress Saliva Secretion Stimulated by Pilocarpina and Noradrenaline in Mice. *Biol Pharm Bull* 1996;19(3):384-7.

Kuijper-Lenstra AH, Kramer MF. Rate of protein synthesis in rat salivary gland cells after pilocarpine or feeding. III. Protein synthesis in vitro in the submandibular and parotid gland after stimulation of secretion in vivo. *Cell Tissue Res* 1975;164(4):457-66.

Kuijper-Lenstra AH, Kramer MF, van Venrooij WJ. Rate of protein synthesis in rat salivary gland cells after pilocarpine or feeding. II. Protein synthesis in vivo in cells of the submandibular and parotid gland after secretion. *Cell Tissue Res* 1975;164(4):447-56.

Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;55(1):65-85.

Leal A, Pedroso FI, Nicolau J. The effect of food deprivation on the activities of some enzymes of the metabolism of carbohydrates in the submandibular salivary glands of rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1980;50(1):92-5.

Li J, Lee S, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Lee JH, et al. Effects of pilocarpine on the secretory acinar cells in human submandibular glands. *Life Sci* 2006;79(26):2441-7.

Libal-Weksler Y, Gotlibovitz O, Stark AH, Madar Z. Diet and diabetic state modify glycogen synthase activity and expression in rat hepatocytes. *J Nutr Biochem* 2001;12(8):458-64.

Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ. Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen. *FEBS Lett* 1991;279(2):223-8.

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

Mahay S, Adeghate E, Lindley MZ, Rolph CE, Singh J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid contents in the isolated rat parotid salivary gland. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):175-81.

Malaisse WJ, Ladriere L, Cancelas J, Acitores A, Villanueva-Penacarrillo ML, Valverde I. Pancreatic and hepatic glycogen content in normoglycemic and hyperglycemic rats. *Mol Cell Biochem* 2001;219(1-2):45-9.

Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(4):187-200.

Masharani UK, J.H. Pancreatic Hormones & Diabetes Mellitus. In: Greenspan FG, Basic and endocrinology. New York; 2001. p. 623.

Menaker L, Miller SA. Regulation of submandibular salivary gland protein synthesis in the developing rat. The effect of food deprivation on polysome isolation and amino acid incorporation. Arch Oral Biol 1973;18(10):1317-23.

Mickeleborough M. The metabolism of certain carbohydrate constituents on rat submandibular gland. J Dent Res 1967;46:82-6.

Moore PA, Weyant RJ, Etzel KR, Guggenheimer J, Mongelluzzo MB, Myers DE, et al. Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of coronal and root caries. Community Dent Oral Epidemiol 2001;29(3):183-94.

Murai S, Saito H, Masuda Y, Nakamura K, Michijiri S, Itoh T. Effects of short-term (2 weeks) streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine and noradrenaline in the salivary glands and secretory responses to cholinergic and adrenergic sialogogues in mice. Arch Oral Biol 1996;41(7):673-7.

Nannipieri M, Lanfranchi A, Santerini D, Catalano C, Van de Werve G, Ferrannini E. Influence of long-term diabetes on renal glycogen metabolism in the rat. Nephron 2001;87(1):50-7.

Newrick PG, Bowman C, Green D, O'Brien IA, Porter SR, Scully C, et al. Parotid salivary secretion in diabetic autonomic neuropathy. J Diabet Complications 1991;5(1):35-7.

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

Nicolau J, de Souza DN, Martins HR. Pilocarpine-induced increases in the activity of 6-phosphofructo-2-kinase and the fructose-2,6-bisphosphate content of rat salivary glands. Arch Oral Biol 1992;37(6):483-7.

Nicolau J, Rosa R, Fava de Moraes F. The effect of aloxan diabetic upon n-acetilneuraminic acid concentratiopn in the submaxillary glands of rats. Acta Phisiol Lat Am 1962;19:106-10.

Nicolau J, Sassaki KT. Changes in some metabolites contents of the carbohydrate metabolism in mouse submandibular salivary gland after stimulation by isoproterenol. Gen Pharmacol 1982;13(2):153-5.

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

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.

Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 2002;8(3):117-29.

Pedroso FI, Leal A, Rosa R, Nicolau J. Metabolism in vitro of the submandibular salivary gland from rats subjected to various nutritional conditions. *Arch Oral Biol* 1976;21(9):499-502.

Potter D, Ellis S. Isoproterenol- and epinephrine- induced changes in blood glucose and tissue glycogen levels in normal and diabetic rats: the influence of alteration in endogenous insulin levels and state of nourishment. *J Pharm Expl Ther* 1974;193(2):576-85.

Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci* 2007;133(1):3-18.

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212(2):167-78.

Rossignol BH, G Chambaut, AM Keryer, G. The calcium ionophore A23 187 as a probe for studying the role of Ca^{++} ions in the mediation of carbachol effects on rat salivary glands: protein secretion na metabolism of phospholipids na glycogen. *Febs Letters* 1974;43(2):241-6.

Sánchez-Chávez G, Hernández-Berrones J, Luna-Ulloa L, Coffe V, Salceda R. Effects of Diabetes on Glycogen Metabolism in Rat Retina. *Neurochem Res*;In press 2008.

Sasaki KT, Nicolau J. The effect of isoproterenol on some aspects of the anaerobic metabolism of carbohydrates in mouse submandibular gland. *Gen Pharmacol* 1982;13(4):353-6.

Singh M, Singh VN, Venkitasubramanian TA. Early effects of excessive retinol intake on gluconeogenesis. Involvement of adrenals in the increased activities on Gluconeogenic Enzymes of rat. *Arch Biochem Biophys* 1976;173(1):82-92.

Stearns SB, Tepperman HM, Tepperman J. Studies on the utilization and mobilization of lipid in skeletal muscles from streptozotocin-diabetic and control rats. *J Lipid Res* 1979;20(5):654-62.

Stryer L. *Biochemistry*. 3^a ed; New York; W H Freedman & Co; 1988.

Suckow M, Weisbroth SH, Fanklin CL. *The laboratory rat*. 2^aed. United State of America: Elsevier Academic Press; 2006.

Szczepanski A, Mednieks MI, Hand AR. Expression and distribution of parotid secretory proteins in experimental diabetes. *Eur J Morphol* 1998;36 Suppl:240-6.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50(6):537-46.

Takeda M, Ojima M, Yoshioka H, Inaba H, Kogo M, Shizukuishi S, et al. Relationship of serum advanced glycation end products with deterioration of periodontitis in type 2 diabetes patients. *J Periodontol* 2006;77(1):15-20.

Thomopoulos GN, Garrett JR, Proctor GB. Ultrastructural histochemical studies of secretory granule replenishment in rat submandibular granular tubules after cycloctidine-induced secretion. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002;34(3):279-89.

Thomopoulos GN, Garrett JR, Proctor GB, Hartley R, Zhang XS. Exocytosis from rat submandibular granular tubules during cycloctidine stimulation shows unusual features, including changes in the granule membrane. *Microsc Res Tech* 1996;35(5):365-76.

Tobin G, Giglio D, Gotrick B. Studies of muscarinic receptor subtypes in salivary gland function in anaesthetized rats. *Auton Neurosci* 2002;100(1-2):1-9.

Vatta MS, Hope SI, Prendes GM, Bianciotti LG, Elverdin JC, Fernandez BE. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. *Auton Autacoid Pharmacol* 2002;22(2):65-71.

Wang PL, Purushotham KR, Humphreys-Beher MG. Effect of chronic insulin administration on mouse parotid and submandibular gland function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;205(4):353-61.

Watanabe M, Yamagishi-Wang H, Kawaguchi M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol* 2001;87(2):117-24.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27(5):1047-53.

Zebrowsky EB, Brimmer M. Effect of aloxan diabetes on a-amylase and sialic acid levels in the parotid and submandibular glands of rat. *Pham Ther Dent* 1978;3:7-16.

APÊNDICE A- Concentração de glicogênio (μg de glicogênio/g tecido) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular				
Glicogênio (μg glicogênio/g tecido)				
Controle		Diabético		
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	1,44	0,87	2,51	1,39
	$\pm 0,15$ *	$\pm 0,11$	$\pm 0,18$ *	$\pm 0,16$
T30	0,76	0,56	0,48	0,46
	$\pm 0,23$	$\pm 0,04$	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$
T60	1,14	1,01	1,41	0,60
	$\pm 0,18$	$\pm 0,21$	$\pm 0,39$ *	$\pm 0,06$
T120	1,64	1,19	1,70	0,60
	$\pm 0,21$ *	$\pm 0,16$	$\pm 0,11$ *	$\pm 0,04$

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA, $p > 0,05$;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE B- Atividade da glicogênio sintase ativa (mU/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GS ativa (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	4,15	1,84	7,91	9,92
	±0,71	±0,72	±1,60	±3,72
T30	5,29	11,02	3,37	15,70
	±1,29 *	±3,93	±0,97 *	±8,22
T60	8,54	3,09	9,47	10,90
	±1,61 *	±1,71	±3,84	±4,18
T120	5,46	2,21	16,94	7,17
	±1,66	±0,66	±6,67 *	±0,79

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE C- Atividade da glicogênio sintase total (mU/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GS total (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	22,16	5,76	10,49	15,85
	±2,96 *	±3,32	±3,50	±5,29
T30	26,32	14,93	22,15	35,03
	±6,63 *	±4,07	±6,87 *	±11,41
T60	41,85	19,66	41,79	28,96
	±3,49 *	±3,05	±6,08 *	±2,14
T120	33,00	5,19	36,07	8,55
	±5,37 *	±1,61	±9,05 *	±3,54

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE D- Atividade da glicogênio foforilase ativa (U/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GP ativa (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,040	0,008	0,049	0,031
	±0,015 *	±0,001	±0,010 *	±0,005
T30	0,028	0,009	0,033	0,019
	±0,007 *	±0,002	±0,006 *	±0,006
T60	0,022	0,023	0,019	0,015
	±0,007	±0,004	±0,004	±0,003
T120	0,024	0,018	0,021	0,020
	±0,003	±0,002	±0,007	±0,004

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE E- Atividade da glicogênio foforilase total (U/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GP total (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,071	0,014	0,074	0,052
	±0,020 *	±0,001	±0,017 *	±0,014
T30	0,053	0,013	0,057	0,036
	±0,009 *	±0,003	±0,014 *	±0,011
T60	0,045	0,031	0,045	0,030
	±0,014 *	±0,008	±0,013 *	±0,006
T120	0,046	0,029	0,053	0,044
	±0,004 *	±0,003	±0,011 *	±0,001

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE F- Concentração de glicogênio (μg de glicogênio/g tecido) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida				
Glicogênio (μg glicogênio/g tecido)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,41	0,39	1,03	0,65
	$\pm 0,10$	$\pm 0,11$	$\pm 0,19^*$	$\pm 0,15$
T30	0,32	0,39	0,99	0,38
	$\pm 0,06$	$\pm 0,16$	$\pm 0,32^*$	$\pm 0,07$
T60	0,51	0,51	0,85	0,65
	$\pm 0,14$	$\pm 0,15$	$\pm 0,23$	$\pm 0,16$
T120	0,67	0,54	0,81	0,65
	$\pm 0,8$	$\pm 0,13$	$\pm 0,22$	$\pm 0,18$

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA, $p > 0,05$;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE G- Atividade da glicogênio sintase ativa (mU/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida				
GS ativa (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	5,78	3,12	2,69	5,23
	±0,97	±0,84	±0,85 *	±1,46
T30	8,06	4,26	6,08	4,57
	±2,24 *	±0,91	±1,24	±0,82
T60	8,57	22,54	8,41	3,31
	±1,67 *	±3,75	±3,65 *	±1,20
T120	10,01	2,96	6,39	7,25
	±2,51	±1,05	±1,25	±2,31

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE H- Atividade da glicogênio sintase total (mU/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida				
GS total (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	7,35	5,07	18,24	10,21
	±1,47	±2,00	±2,91	±3,15
T30	9,71	9,97	29,61	9,77
	±1,97	±1,04	±13,54 *	±1,53
T60	15,87	43,37	10,18	21,59
	±5,92 *	±9,61	±3,91 *	±5,57
T120	26,70	3,59	29,89	13,89
	±9,07 *	±0,92	±8,52 *	±2,35

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE I- Atividade da glicogênio forilase ativa (U/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida				
GP ativa (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,024	0,007	0,019	0,016
	±0,007	±0,001	±0,003 *	±0,004
T30	0,013	0,009	0,013	0,004
	±0,005	±0,005	±0,004 *	±0,001
T60	0,016	0,010	0,008	0,011
	±0,006 *	±0,001	±0,004 *	±0,001
T120	0,018	0,004	0,015	0,009
	±0,004 *	±0,001	±0,003 *	±0,001

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE J- Atividade da glicogênio forforilase total (U/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de pilocarpina (7,5 mg/kg p.c.)

Parótida				
GP total (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
Pilocarpina	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,029	0,010	0,027	0,016
	$\pm 0,008$ *	$\pm 0,001$	$\pm 0,005$ *	$\pm 0,004$
T30	0,020	0,010	0,014	0,007
	$\pm 0,006$ *	$\pm 0,003$	$\pm 0,005$ *	$\pm 0,001$
T60	0,025	0,012	0,022	0,013
	$\pm 0,004$ *	$\pm 0,001$	$\pm 0,004$ *	$\pm 0,001$
T120	0,020	0,009	0,019	0,012
	$\pm 0,003$ *	$\pm 0,003$	$\pm 0,004$ *	$\pm 0,001$

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA, $p > 0,05$;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE K- Concentração de glicogênio (μg de glicogênio/g tecido) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Submandibular				
Glicogênio μg glicogênio/g tecido				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	1,05	1,29	1,65	1,41
	$\pm 0,19$	$\pm 0,091$	$\pm 0,34$	$\pm 0,13$
T30	1,04	0,71	1,13	0,61
	$\pm 0,10$ *	$\pm 0,31$	$\pm 0,23$ *	$\pm 0,15$
T60	0,92	0,66	1,10	0,33
	$\pm 0,22$	$\pm 0,11$	$\pm 0,30$ *	$\pm 0,05$
T120	1,08	1,27	0,90	0,80
	$\pm 0,19$	$\pm 0,13$	$\pm 0,18$	$\pm 0,07$

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA, $p > 0,05$;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE M- Atividade da glicogênio sintase ativa (mU/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GS ativa (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	7,48	7,66	21,93	4,93
	±2,23	±0,65	±6,17 *	±1,11
T30	7,21	4,54	6,50	6,77
	±0,91	±1,39	±0,84	±1,90
T60	4,01	4,38	6,97	20,56
	±1,19	±1,29	±1,37 *	±3058
T120	6,98	4,89	5,85	16,49
	±2,42	±1,61	±0,81 *	±6,26

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE N- Atividade da glicogênio sintase total (mU/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GS total (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	22,23	32,01	29,01	15,63
	±7,19 *	±6,91	±7,34 *	±6,78
T30	31,48	11,41	38,37	13,25
	±4,31 *	±2,71	±4,15 *	±1,88
T60	17,40	13,43	22,22	24,73
	±4,45	±2,98	±5,16	±5,83
T120	30,62	16,13	24,61	29,27
	±10,07 *	±1,88	±4,45	±11,91

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE O- Atividade da glicogênio foforilase ativa (U/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GP ativa (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,034	0,021	0,035	0,013
	$\pm 0,013$ *	$\pm 0,002$	$\pm 0,003$ *	$\pm 0,008$
T30	0,029	0,032	0,060	0,026
	$\pm 0,013$	$\pm 0,009$	$\pm 0,011$ *	$\pm 0,009$
T60	0,012	0,025	0,019	0,027
	$\pm 0,002$ *	$\pm 0,004$	$\pm 0,003$	$\pm 0,005$
T120	0,021	0,025	0,025	0,018
	$\pm 0,006$	$\pm 0,003$	$\pm 0,005$	$\pm 0,001$

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA, $p > 0,05$;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE P- Atividade da glicogênio foforilase total (U/mg proteína) da glândula SM de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Submandibular				
GP total (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,067	0,035	0,044	0,031
	±0,008 *	±0,005	±0,004	±0,019
T30	0,054	0,047	0,081	0,041
	±0,006	±0,008	±0,015 *	±0,021
T60	0,041	0,047	0,052	0,042
	±0,006	±0,006	±0,007	±0,008
T120	0,037	0,042	0,045	0,021
	±0,006	±0,006	±0,007 *	±0,005

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE Q- Concentração de glicogênio (μg de glicogênio/g tecido) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Parótida				
Glicogênio μg glicogênio/g tecido				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,71	0,34	1,52	0,86
	$\pm 0,14$ *	$\pm 0,05$	$\pm 0,49$ *	$\pm 0,25$
T30	0,66	0,37	0,72	0,43
	$\pm 0,25$	$\pm 0,14$	$\pm 0,10$	$\pm 0,09$
T60	0,74	0,46	0,82	0,44
	$\pm 0,23$	$\pm 0,07$	$\pm 0,17$ *	$\pm 0,10$
T120	0,68	1,26	0,54	1,28
	$\pm 0,14$ *	$\pm 0,39$	$\pm 0,11$ *	$\pm 0,29$

Média $\pm$ DP, $8 \leq n \leq 10$;

ANOVA, $p > 0,05$;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE R- Atividade da glicogênio sintase ativa (mU/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Parótida				
GS ativa (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	5,21	5,17	3,79	9,67
	±1,21	±1,26	±0,55 *	±3,53
T30	4,73	8,88	3,87	5,57
	±1,19 *	±2,03	±1,49	±1,01
T60	13,52	6,57	3,98	6,26
	±2,55 *	±0,98	±0,64	±1,36
T120	14,35	10,12	10,52	7,59
	±2,45 *	±3,16	±1,71	±2,96

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE S- Atividade da glicogênio sintase total (mU/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Parótida				
GS total (mU/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	8,39	8,83	20,57	13,49
	±2,12	±2,99	±1,47	±5,72
T30	12,17	23,96	25,05	9,91
	±3,59 *	±7,31	±4,03 *	±2,34
T60	25,97	8,21	8,21	16,55
	±2,81 *	±1,77	±1,77	±3,62
T120	26,17	22,33	15,47	22,52
	±3,61	±16,63	±1,41	±5,72

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo

APÊNDICE T- Atividade da glicogênio fosforilase ativa (U/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Parótida				
GP ativa (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,011	0,045	0,011	0,025
	±0,002 *	±0,011	±0,003 *	±0,009
T30	0,008	0,008	0,011	0,011
	±0,001	±0,001	±0,003	±0,001
T60	0,014	0,009	0,010	0,014
	±0,004	±0,002	±0,002	±0,003
T120	0,016	0,006	0,015	0,018
	±0,002 *	±0,001	±0,002	±0,001

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

APÊNDICE U- Atividade da glicogênio foforilase total (U/mg proteína) da glândula P de ratos diabéticos (D) e controles (C) alimentados e em jejum, após zero, 30, 60 e 120 minutos da injeção de IPR (5,0 mg/kg p.c.)

Parótida				
GP total (U/mg proteína)				
Controle			Diabético	
IPR	Alimentado	Jejum	Alimentado	Jejum
T0	0,016	0,053	0,013	0,034
	±0,002 *	±0,017	±0,003 *	±0,012
T30	0,013	0,011	0,016	0,014
	±0,001	±0,002	±0,006	±0,001
T60	0,023	0,018	0,018	0,018
	±0,007	±0,001	±0,002	0,003
T120	0,022	0,010	0,016	0,021
	±0,003 *	±0,003	±0,004	±0,005

Média ± DP, 8≤n≤10;

ANOVA, p>0,05;

*Significa diferença entre alimentado e jejum no mesmo tempo.

ANEXO A- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIAPROTOCOLO nº 16/04
PARECER nº 16/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *“Estudo in vitro e in vivo do metabolismo de glicogênio em glândulas salivares de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina”*, de responsabilidade da pesquisadora Emily Ganzerla, sob orientação do Professor Doutor José Nicolau.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01(um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em “cd” ou “disquete” ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 16 de novembro de 2004

Prof. Dr. CELSO LUIZ CALDEIRA

PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP