MARIANA FERREIRA LEITE

**ESTUDO TEMPORAL DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE
TUNGSTATO DE SÓDIO SOBRE ALGUNS PARÂMETROS DE
GLÂNDULAS SALIVARES E SALIVA DE RATAS DIABÉTICAS**

São Paulo

2006

Mariana Ferreira Leite

**Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio
sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas
diabéticas**

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

2006

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

Leite, Mariana Ferreira

Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas/ Mariana Ferreira Leite; orientador José Nicolau. -- São Paulo, 2006.

109p. : fig., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais Dentários) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Glândulas salivares – Tungstato de Sódio – Efeitos 2. Saliva - Tungstato de Sódio – Efeitos 3. Diabetes Mellitus 4. Matérias dentários

CDD 617.63
BLACK D15

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leite MF. Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2006.

São Paulo, 22 de maio de 2006.

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: _____

Mar Português

Ó mar salgado, quanto do teu sal
São lágrimas de Portugal!
Por te cruzarmos, quantas mães choraram,
Quantos filhos em vão rezaram!
Quantas noivas ficaram por casar
Para que fosses nosso, ó mar!

Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.
Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Marina menina, meu orgulho, minha inspiração e
motivação para todos os meus esforços. Desculpa-me pela ausência em
determinado momento de nossas vidas, saiba que todo meu sacrifício é para que
você tenha o mundo a seus pés. Te amo minha filha.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu querido orientador Professor José Nicolau

O grande mestre é aquela pessoa que identifica talentos ocultos e os canalizam para o rumo correto. O senhor foi a pessoa que descobriu minha vocação, despertou meu interesse pela investigação e me motivou pela decisão de trilhar esse caminho. O senhor foi um grande exemplo que influenciou minha escolha. Esse exemplo a que me refiro não pode ser contabilizado em nenhuma base de dados como Medline ou coisas do gênero. Infelizmente, não há Currículo Lattes que possa registrar o exemplo de seriedade, honestidade e sinceridade que o senhor nos ensinou, além do exemplo de dedicação à pesquisa, à Universidade de São Paulo, à FAPESP. Agradeço pelos nossos seminários, pelas críticas que me ensinaram a me expressar e sobretudo a ter a sofisticação de saber ouvir. Agradeço pela compreensão e carinho paternal que recebi nos momentos que precisei. Saiba que sou sua discípula e sua fiel seguidora.

AGRADECIMENTOS

À minha super mãe pelo apoio INCONDICIONAL em todos os momentos de minha vida e de minha formação, obrigada pelo exemplo de mulher batalhadora e perseverante.

A toda minha família, meus irmãos, meus avós, tios e primos que sempre torceram pelo meu sucesso, obrigada pelo carinho.

Ao Alexandre, meu companheiro durante todo o período de realização desse trabalho, obrigada pela compreensão e apoio nas minhas decisões, pela amizade, amor e carinho. Fico muito feliz pelo fruto da relação que construímos, colhemos hoje muita admiração e amizade um pelo outro, além de uma filha linda, inteligente e amada.

Ao Genésio e Heliana, grandes amigos que guardo no coração. Tenho muita admiração pela trajetória de vida desse casal que me ensinou que a vida é bela. A serenidade e otimismo que admiro em vocês me ajudaram em muitos momentos da minha tese. Também agradeço a minha segunda mãe, Leila Gomes dos Santos.

Aos meus queridos amigos do laboratório Douglas, Fernando, Emily, Walter, Fausto, Monique, Jonas, Paulinha, Helena, Alyne, Ana Paula. Obrigada pela paciência de agüentar minhas reclamações e divagações e desculpa-me por falar além da conta em certos momentos. A presença de vocês tornou a realização desse trabalho um

prazer. O clima de alegria e amizade do laboratório vai fazer muita falta na próxima etapa da minha vida, acho que não sei viver sem vocês.

A minha amiga-irmã Emily por toda tua amizade, pelas sessões de terapia coletiva, pelos conselhos racionais, pela companhia em muitos momentos da minha vida. Obrigada minha irmãzinha.

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

Aos professores do Departamento de Materiais Dentários, especialmente a Rosa Helena Miranda Grande, Leonardo Eloy Rodrigues Filho e Carlos Eduardo Francci, pela confiança em meu trabalho e pelas oportunidades concedidas.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários, pela colaboração em todos os momentos que precisei. Obrigada Rosinha por me acudir nos apuros passados, sempre com muito carinho.

Aos amigos do Parc Científic de Barcelona pela amizade com que me receberam, Dr Joan Guinovart, Jorge, Mar, Delia, Laura, Suzana, Anna, Daniel, Carles, David, Oscar, Emma, Jordi, Helena. Encantada por conocerlos, muchísimas gracias por todo el cariño y amistad.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro. Pela concessão da bolsa de estudo de doutorado e pelo uso da reserva técnica para a realização do estágio sanduíche no exterior.

Ao Parc Científic de Barcelona – Universidade de Barcelona, Laboratório de Enginyeria Metabòlica i Teràpia de la Diabetis pelo espaço concedido para a realização de parte deste trabalho de tese.

Leite MF. Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2006.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da administração do tungstato de sódio (2 mg/ml) num período de 6 semanas sobre alguns parâmetros de parótida, submandibular e saliva de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina. Os grupos estudados foram divididos em controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético (D) e diabético tratado (DT). Os parâmetros estudados foram o metabolismo energético, a composição protéica das glândulas e de saliva total estimulada por pilocarpina e isoproterenol, bem como a via de secreção de proteínas. No metabolismo energético foi determinada a concentração de glicogênio e a atividade enzimática da hexoquinase, fosfofrutoquinase-1, piruvato quinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase. Foram determinadas a concentração de proteína total, a atividade enzimática da amilase e peroxidase e o teor de ácido siálico em glândulas salivares e saliva. A via de secreção de proteínas foi estudada pela avaliação da expressão de proteína quinase C por western blot. Os resultados obtidos confirmam o potencial hipoglicemiante do tungstato de sódio, bem como sua ação no controle da polifagia, da polidipsia e do peso corporal e glandular. A concentração de glicogênio sofreu um incremento nos grupos diabéticos e o tratamento com tungstato de sódio potencializou esse aumento nas glândulas salivares. A glândula parótida sofreu um aumento de alguns parâmetros da via glicolítica e de sua composição protéica nas semanas iniciais do estudo, com normalização nas semanas finais. O

tungstato se mostrou efetivo no controle da atividade de peroxidase em glândulas salivares, com efeitos pouco significativos sobre os demais parâmetros estudados. Os animais diabéticos apresentaram um aumento da proteína total em saliva, porém nenhuma diferença foi observada na atividade da amilase e peroxidase. O tungstato de sódio potencializou o aumento da concentração de proteínas causado pelo diabetes além de reduzir a atividade da amilase na saliva dos animais controle e diabético tratados. A glândula submandibular de ratos diabéticos sofreu uma estimulação na expressão de PKC ativa e inativa após uma semana experimental, além de uma alteração do perfil das isoformas da enzima, o tungstato de sódio potencializou esse aumento. Conclusão: O papel do tungstato de sódio no restabelecimento do metabolismo energético não foi observado em parótida e submandibular, mostrando que esse composto não modifica o metabolismo de tecidos periféricos como as glândulas salivares. A ação do tungstato de sódio sobre a atividade da peroxidase em glândulas salivares indica que esse composto pode atuar como auxiliar no sistema antioxidante no organismo. O tungstato de sódio potencializa uma das vias de secreção de saliva pelo estímulo da PKC.

Palavras-Chave: Glândulas salivares, saliva, diabetes, tungstato de sódio

Leite MF. Time course study of sodium tungstate administration on some parameters of salivary gland and saliva of diabetic rats
[Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2006.

ABSTRACT

The aim of study was evaluate the effect of sodium tungstate administration (2mg/ml) on some parameters of parotid, submandibular and pilocarpine/isoproterenol stimulated saliva of streptozotocin induced-diabetes, during six weeks. The groups were divided in untreated control (C), treated control (CT), untreated diabetic (D) and treated diabetic (DT). The parameters studied were energetic metabolism, proteic composition of glands and saliva, besides the protein secretion pathway. In the energetic metabolism were determinated hexokinase, phosphofructokinase-1, pyruvate kinase, glycose-6-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase activities. Were evaluated the total protein concentration, amylase and peroxidase activities and free and total sialic acid content on saliva and salivary glands. The protein secretion pathway was studied by evaluation of expression of protein kinase C by western blot. The results obtained confirm the tungstate potential as hypoglycemic, as well as its action in the polifagia, polidipsia and body and glandular weight control. The glycogen concentration suffered an increment in the diabetic group and the tungstate treatment potentialized the increase in the salivary glands. Parotid glands suffered an increased in some parameters of glycolitic pathway and its protein composition in the initial weeks of study, with normalization in the end of experiment. The tungstate was effective in the control of peroxidase activity in salivary glands, but few effects on the other parameters. Diabetic animals presented

an increased of total protein concentration in saliva, but no difference was observed in the amylase and peroxidase activities. Sodium tungstate caused an increased in the total protein concentration and a reduction on amylase activity of saliva in the CT and DT groups. Submandibular gland of diabetic rats suffered stimulation in the active and inactive PKC expression after one week and alteration in the isoforms profile of enzyme. Sodium tungstate potencialized this increased. Conclusion: In this study, was not observed effect of sodium tungstate on energetic metabolism of parotid and submandibular, showing that this compound does not alter the metabolism in the peripheral tissue as salivary glands. The tungstate acts on peroxidase activity, this show the possible action of this compound in the antioxidant system. Sodium tungstate stimulates the protein secretion pathway in the salivary glands.

Keywords: Salivary glands, saliva, diabetes and sodium tungstate

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Diabetes Melito.....	19
2.2 Diabetes Melito e glândulas salivares.....	24
2.3 Diabetes Melito e tungstato de sódio.....	32
3 PROPOSIÇÃO.....	36
4 MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1 Animais e indução do diabetes.....	37
4.2 Tratamento com tungstato de sódio.....	37
4.3 Obtenção das amostras.....	38
4.3.1 Coleta da saliva.....	38
4.3.2 Obtenção das glândulas parótida e submandibular.....	39
4.4 Análises.....	39
4.4.1 Determinação da glicemia.....	39
4.4.2 Determinação de Proteína.....	40
4.4.3 Determinação da atividade enzimática da amilase.....	40
4.4.4 Determinação da atividade enzimática da peroxidase.....	41
4.4.5 Determinação de ácido siálico.....	41
4.4.6 Determinação da concentração de glicogênio.....	42
4.4.7 Determinação das enzimas hexoquinase (HK), fosfrutoquinase 1 (PFK-1), piruvato quinase (PK), e glicose-6-desidrogenase (G6PD), lactato desidrogenase (LDH).....	43
4.4.8 Western Blot da proteína quinase C (PKC).....	44

4.5 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
6 DISCUSSÃO.....	82
7 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO.....	108

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito é uma enfermidade metabólica que desequilibra o sistema anabólico do organismo, com comprometimento do metabolismo de carboidrato, lipídeos e proteínas. A hiperglicemia causada pelo diabetes causa complicações tardias degenerativas como cardiopatias, arteriosclerose, micro e macroangiopatias, neuropatias, nefropatias, retinopatias. Além dessas implicações gerais, algumas patologias orais são manifestadas em decorrência do diabetes, entre elas xerostomia, gengivite, periodontite abscessos dentais e freqüentemente lesões na mucosa e língua.

A xerostomia é um dos principais sintomas manifestados por pacientes diabéticos. Assim, a saliva e as glândulas salivares de indivíduos e animais diabéticos têm sido foco de investigação. As glândulas salivares apresentam uma série de alterações na sua composição histológica, com acúmulo de tecido adiposo. Há mudanças na sensibilidade de receptores do sistema nervoso autônomo, com comprometimento da resposta adrenérgica e colinérgica. Além disso, já foram observadas em glândulas salivares possíveis microangiopatias manifestadas pela alteração em sua vasodilatação, um desequilíbrio do sistema antioxidante e alteração no metabolismo de glicose e glicogênio.

O tungstato de sódio é um composto que tem sido investigado como alternativa no tratamento do diabetes. Este composto possui ação insulinomimética em ratos diabéticos e tem se mostrado como um potente agente hipoglicemiante capaz de controlar o peso corporal, a polifagia e polidipsia em diferentes modelos animais de diabetes tipo 1 (ratos STZ) e de tipo 2 (ratos nSTZ e ZDF). O mecanismo

de ação do tungstato ainda não está bem definido, porém há muitos relatos que apontam que sua administração restabelece o metabolismo de glicogênio hepático através da estimulação da glicogênio sintase e diminui a gliconeogênese pela inibição da glicose-6-fosfatase. O tungstato de sódio aumenta o influxo glicolítico pela estimulação da atividade de algumas enzimas chaves da glicólise em fígado e hepatócitos isolados, portanto esse composto estimula a obtenção de energia pela estimulação da via glicolítica. Além disso, há indícios de que o tungstato de sódio estimula a síntese de insulina e a regeneração de células β no pâncreas.

Há relatos que mostram o efeito do tungstato em outros tecidos que não estão envolvidos diretamente com o controle da homeostase, manutenção da glicemia e do metabolismo anabólico. A administração de tungstato de sódio causa uma normalização da hiperglicemia e hiperlipidemia diminuindo os riscos de cardiopatias, além de melhorar o desempenho da musculatura cardíaca. Outro estudo mostrou que o tungstato de sódio recupera a capacidade reprodutiva através da proliferação de células de Leydig em testículos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Não há relatos do efeito do tungstato de sódio sobre as glândulas salivares.

Assim, o propósito do nosso estudo foi investigar a ação do tungstato de sódio em alguns parâmetros de glândulas salivares de ratas diabéticas induzidas pela injeção intraperitoneal de estreptozotocina. Estudamos o metabolismo energético, através da determinação da concentração de glicogênio, da atividade de alguns parâmetros da via glicolítica, da via das pentoses e do metabolismo anaeróbico. Outro foco do estudo foi a determinação da composição protéica de parótida, submandibular e saliva total estimulada por pilocarpina e isoproterenol nos grupo experimentais estabelecidos. Os parâmetros estudados foram a concentração

de proteína total, a atividade enzimática da peroxidase e amilase e o teor de ácido siálico livre e total. Além do metabolismo energético e da composição protéica de glândulas salivares e saliva, também avaliamos a expressão de proteína quinase C (PKC) como um possível indicativo da via de sinalização da síntese de proteínas em glândulas salivares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Melito

O número de indivíduos diagnosticados com diabetes tem aumentado dramaticamente em todo o mundo devido ao crescimento populacional, aumento da expectativa de vida, da incidência de obesidade, diminuição de práticas de atividades físicas, entre outras. As projeções para a prevalência de diabetes para o ano 2030 apontam aproximadamente 366 milhões de indivíduos em todo mundo e 11.3 milhões no Brasil (WILD et al., 2004).

O diabetes melito é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia e por manifestações tardias degenerativas. Essa enfermidade metabólica é classificada como tipo 1, por ocorrer uma deficiência na produção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas e como tipo 2, um quadro associado à resistência à insulina com diminuição da sensibilidade de receptores celulares e outros agravantes. Há outros tipos diabéticos, porém numa menor incidência.

As principais manifestações clínicas do aumento da glicemia são polifagia, poliúria, polidipsia, hálito cetônico, que ocorre pela presença de corpos cetônicos. O aumento de corpos cetônicos no sangue causa um quadro de acidose, podendo levar o indivíduo ao coma, especialmente no diabetes tipo 1. O aumento da pressão osmótica no líquido extracelular, causada pelo excesso de glicose, dificulta a circulação periférica. Alguns tecidos, como o cérebro, retina e epitélio germinativo das gônadas, não necessitam de receptores de insulina para o uso de glicose.

Assim, no cérebro o aumento da glicemia causa choque hipovolêmico, irritabilidade nervosa progressiva, desmaio e convulsão (GUYTON; HALL, 1997).

De modo geral, as formas de diabetes tipo 1 e tipo 2 são caracterizadas por hiperglicemia crônica relacionada ao aparecimento de complicações tardias degenerativas. Alterações macrovasculares estão freqüentemente associadas ao diabetes e afetam artérias que suprem o coração, cérebro e extremidade corporal. As micro e macroangiopatias diabéticas estão correlacionadas à hiperglicemia e são responsáveis por impotência sexual, arteriosclerose, retinopatias, neuropatia e nefropatia (BROWNLEE; CERAMI, 1981).

A insulina é um hormônio sintetizado pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, que ao se ligar aos receptores existentes na membrana plasmática das células alvo desencadeia uma complexa cascata de fosforilações responsáveis pela ação final da insulina no metabolismo anabólico. A presença de receptores de insulina em glândula submandibular foi demonstrada com a utilização de insulina marcada com ^{125}I (SCACCHI; TURYN; DELLACHA, 1988).

A insulina é um hormônio anabolizante que atua no armazenamento de substâncias energéticas e possui papel importante no metabolismo de carboidratos, proteína e lipídios. Ela aumenta a permeabilidade celular através da estimulação da síntese de transportadores de glicose (GLUTs) e sua translocação para a membrana plasmática. Além disso, a insulina estimula a via glicolítica e a síntese de glicogênio hepático e muscular pela ativação da glicogênio sintase e inibição da glicogênio fosforilase. A insulina também promove o armazenamento de ácidos graxos e glicerol no tecido adiposo na forma de triacilglicerol e impede a degradação de gorduras pela inibição da lipase sensível a hormônios. No metabolismo de proteínas,

a insulina estimula a tradução no RNA-mensageiro, inibe a degradação de proteínas e deprime a taxa de gliconeogênese (GUYTON; HALL, 1997).

A falta de insulina proporciona a ativação da glicogênio fosforilase e da lipase sensível á hormônios, causa a depleção protéica e o aumento de aminoácidos plasmáticos, inibe o crescimento, estimula a conversão dos excessos de ácidos graxos em fosfolipídios e colesterol e a oxidação deles em corpos cetônicos como a acetona, o ácido acetoacético e o ácido β -hidroxibutirato, entre outras. Assim, além de hiperglicemia, o indivíduo diabético freqüentemente apresenta um aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea e lipogênese ectópica, gerando um quadro de glicotoxicidade e lipotoxicidade (GUYTON; HALL, 1997).

Muitos relatos presentes na literatura esclarecem como o diabetes afeta o metabolismo de carboidratos. Ao ser encaminhada através da membrana plasmática pela ação do GLUT, a glicose sofre uma fosforilação pela atividade da hexoquinase, um mecanismo para sua manutenção no meio intracelular. A atividade da hexoquinase é determinante não apenas para a síntese de energia pelo desencadeamento da via glicolítica, como também para a síntese de glicogênio hepático e muscular. Alguns autores (FRANK; FROMM, 1986) mostraram uma diminuição da atividade dessa enzima e de sua síntese em musculatura esquelética de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. A fosfofrutoquinase (PFK) é uma importante enzima reguladora da via glicolítica que catalisa a formação de frutose-1,6-bisfosfato a partir da frutose-6-fosfato. Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentaram uma redução da atividade máxima da PFK-1 e da concentração de seu produto de reação em musculatura esquelética comparado com animais controle (CHEN-ZION; LIVNAT; BEITNER, 1994). Há relatos da correlação entre o diabetes tipo 2 e a deficiência da atividade da fosfofrutoquinase

(PFK) e da piruvato quinase (BOUCHÉ et al., 2004). A lactato desidrogenase é uma enzima que direciona o piruvato, produto da via glicolítica, para uma via anaeróbica, com a formação de lactato. A hiperlactactemia pode levar a uma resistência à insulina por aumentar a gliconeogênese no fígado e diminuir a captação de glicose na musculatura esquelética. Porém, esses resultados foram demonstrados em animais e não em humanos (BOUCHÉ et al., 2004).

Além de comprometimento da via glicolítica pela inibição da síntese ou da atividade de suas enzimas, o diabetes desencadeia uma série de alterações mitocondriais, afetando também a síntese de ATP e a formação de agentes redutores antioxidantes, o que aumenta a susceptibilidade celular a estress oxidativo. Em condições normais, a cadeia respiratória mitocondrial gera um gradiente de prótons, cuja energia é utilizada para síntese de ATP. Quando há uma alta estimulação desse processo, por exemplo através de uma hiperglicemia, ocorre um desequilíbrio nesse gradiente de prótons transmembrânico e uma alteração do potencial de membrana mitocondrial, estimulando a geração de superóxidos.

Há quatro principais hipóteses de como a hiperglicemia pode acarretar as micro e macroangiopatias diabéticas. Aumento do fluxo da via de formação de 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 são os quatro mecanismos moleculares relacionados com o aparecimento de patologias diabéticas e que são desencadeados pela produção intracelular de superóxidos (BROWNLEE, 2001; ROLO; PALMEIRA, 2006). A figura 2.1 mostra a correlação desses 4 fatores. A hiperglicemia estimula a conversão de glicose em sorbitol e frutose com consumo de NADPH e glutatona. A diminuição de redutores antioxidantes causa uma maior

susceptibilidade a estress oxidativo associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular. A hiperglicemia aumenta a demanda pela via glicolítica. A produção de superóxidos inibe a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, gerando um aumento na taxa NADH/NAD^+ e um contra-fluxo da via glicolítica, com o direcionamento para a síntese de novo de diacilglicerol (DAG). O aumento na formação de diacilglicerol estimula diferentes isoformas de PKC. A ativação de isoformas de PKC tem inúmeras consequências patológicas, afetando a expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), endotelina-1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador ($\text{TGF-}\beta$), inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e pela ativação de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ e NAD(P)H oxidase. A alteração desses fatores está relacionada à anormalidade no fluxo sanguíneo, permeabilidade e capilaridade vascular, bem como à produção de mediadores pró-inflamatórios. A hiperglicemia pode ocasionar a glicosilação de proteínas, aumentando a produção intracelular de AGE, o que compromete a integridade celular pela modificação da função protéica ou pela produção intracelular de ROS. A hiperglicemia e a produção de superóxidos também estimulam a via de hexosamina com a produção final de UDP-N-acetilglicosamina, um importante substrato para glicosilação intracelular. A glicosilação de fatores de transcrição comprometeria a expressão de muitos genes como o de PAI-1 (BROWNLEE, 2001).

Figura 2.1 – Mecanismos moleculares que relacionam a hiperglicemia com o aumento da via de formação de poliol, da via das hexosaminas, formação de AGE e estimulação de PKC. (ROLO; PALMEIRA, 2006)

2.2 Diabetes Melito e glândulas salivares

As glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) são responsáveis por aproximadamente 95% da secreção salivar. Sua disposição básica se compõe por unidades secretoras e um sistema de ductos, sustentados por um tecido conjuntivo. As unidades secretoras, também chamadas de ácinos, são compostas por células mucosas, serosas e mioepiteliais, que variam no tamanho,

forma e número. As células serosas são especializadas na síntese, armazenamento e secreção de proteínas, enquanto que a secreção das células mucosas possui um conteúdo menos enzimático e com maior teor de glicoproteínas. As glândulas salivares menores, com ductos curtos, formam uma pequena massa glandular distribuída por quase toda extensão da cavidade bucal, abaixo da membrana mucosa. Embora produzam apenas aproximadamente 5% da saliva, elas secretam mucoproteínas importantes na formação de película adquirida (TENCATE, 1988).

O fluido proveniente das unidades secretoras das glândulas salivares maiores chama-se secreção primária, ou seja, um meio isotônico composto por água, íons, proteínas, alto teor de sódio e baixo teor de potássio. Ao passar pelo sistema de ductos, o fluido fica hipotônico, com baixo teor de sódio e cloretos, ocorrendo também um transporte ativo de bicarbonato e potássio. A saliva presente na cavidade oral, denominada saliva total, apresenta uma composição distinta daquela sintetizada pelas glândulas salivares e possui microorganismos, células descamadas, restos alimentares, leucócitos e outros componentes que infiltram através da junção dentogengival (TENCATE, 1988).

As glândulas salivares recebem um suprimento nervoso autônomo simpático e parassimpático. A estimulação β -adrenérgica é responsável pela secreção protéica de natureza mais viscosa, enquanto que a α -adrenérgica e colinérgica é responsável pela secreção de água e eletrólitos, com menor concentração de substâncias orgânicas. O processo celular de secreção é denominado de exocitose e ocorre através da estimulação de receptores β -adrenérgico (predominantes na parótida e submandibular) que leva a geração de AMPc, este ao se ligar à proteína quinase A no meio intracelular causa a separação da parte ativa desta enzima, fosforilando proteínas alvo que atuam no processo de exocitose protéica. Outra forma de

estimulação do processo de exocitose é através da estimulação de receptores colinérgicos muscarínicos, que estimula a hidrólise do fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), gerando inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a mobilização de cálcio intracelular no retículo endoplasmático e a formação do complexo cálcio calmodulina, importante no processo de exocitose. O DAG estimula fosforilação da proteína quinase C (PKC). A PKC fosforilada associada à alta concentração de cálcio intracelular promove a exocitose de grânulos de secreção (BAUM, 1993).

As principais funções da saliva presente na cavidade oral são: digestão, pela presença de amilase e lipase; proteção da mucosa bucal através do potencial lubrificante, ocasionado por seu conteúdo glicoproteico; ação mecânica de limpeza e remoção de agregados bacterianos adsorvidos nas proteínas salivares; gustação, não só dissolve e conduz substâncias a serem saboreadas até os botões gustativos, como também participa do processo de desenvolvimento e maturação deles, pela ação da gustina; capacidade tampão, que pode agir de dois modos, primeiro desequilibrando o pH necessário para o crescimento máximo de bactérias, segundo promovendo o tamponamento dos ácidos produzidos pela placa bacteriana, através de bicarbonato e fosfato; exerce influência ecológica pelo seu amplo espectro de proteínas antibacterianas, tais como lisozima, lactoferrina, peroxidase, imunoglobulinas (IgA), proteínas ricas em prolinas e outras; possui um conteúdo iônico e protéico, que contribui para o processo de remineralização e impede a precipitação precoce de cálcio e fosfato, respectivamente (TENCATE, 1988).

Alguns parâmetros salivares têm sido estudados como indicativo de atividade glandular, como por exemplo, amilase em parótida e a peroxidase em

submandibular. Discutiremos a seguir alguns aspectos de determinados componentes salivares avaliados neste estudo.

A amilase é a enzima mais abundante na saliva e secretada principalmente pelas glândulas parótidas. Ela está envolvida com três funções distintas, dá início ao processo de digestão de carboidratos pela hidrólise do amido, possui afinidade por hidroxiapatita, o que lhe confere participação na formação da película adquirida do esmalte e na colonização bacteriana (VACCA SMITH; BOWEN, 2000), além de possuir sítios específicos de ligação com bactérias, por exemplo *streptococcus viridans* (KANDRA et al., 2005).

A peroxidase é uma enzima presente na saliva, secretada principalmente pela glândula submandibular e distribuída por todo o organismo. Está envolvida em diversas funções biológicas, variando de acordo com o seu tipo e localidade. Na presença de H_2O_2 , proveniente do metabolismo bacteriano ou de células como leucócitos, a peroxidase salivar catalisa a transformação de tiocianato, derivado da dieta e do tabaco, em hipotiocianato, que por sua vez inibe o crescimento bacteriano. O espectro antimicrobiano do sistema peroxidase abrange gram positivo e negativo, bactéria de origem não oral, potencial antiviral e antifúngico (IHALIN; LOIMARANTA; TENOVUO, 2005). Além disso, a peroxidase catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, diminuindo a toxicidade celular. Outros tipos, como a mieloperoxidase, podem estar presentes em processos inflamatórios e na placa bacteriana (TENOVUO; PRUITT, 1984).

A mucina presente na saliva atua como lubrificante da mucosa oral, o que representa uma barreira protetora contra atritos, desidratação e danos ambientais na cavidade oral. Esta proteína controla a permeabilidade e a penetração de agentes irritantes e toxinas na mucosa, protegendo-a contra a ação de proteases gerada por

microorganismos, além de outras propriedades como afinidade por bactérias, formando grumos facilmente eliminados pela deglutição. A mucina é uma glicoproteína rica em resíduos de serina e treonina. Entre 40 e 80% da massa da mucina pode ser composta por oligossacarídeos glicosilados em serina e treonina (ZALEWSKA et al., 2000). Um dos principais oligossacarídeos glicosilados nas cadeias protéicas de mucina é o ácido siálico, um derivado do ácido N-acetilneuramínico que ocupa a porção terminal desta cadeia e proporciona viscosidade por suas cargas elétricas negativas (HERP; WU; MOSCHERA, 1979). O ácido siálico possui receptores para *Streptococcus sanguis e oralis* (THYLSTRUP, 1994).

Alguns autores estudaram a relação do diabetes com as alterações no equilíbrio bucal e suas manifestações patológicas. Além das implicações gerais, também ocorrem manifestações bucais associadas a diabetes como xerostomia, perda de dentes, gengivite, periodontite, abscessos dentais e freqüentemente lesões na mucosa e língua (DARNELL; SAUNDERS, 1990).

A xerostomia é um dos principais sintomas relatados por pacientes diabéticos. A xerostomia é um parâmetro subjetivo relatado pelo indivíduo, diagnosticado através de queixas de boca seca, dificuldade de falar, mastigar, deglutir, etc. A hipossalivação é uma medida objetiva que corresponde com a diminuição absoluta do fluxo salivar (DAWES, 2004). Em trabalho realizado no Centro de Pesquisa em Biologia Oral (dados submetidos à publicação), indivíduos diabéticos do tipo 2 descompensados apresentaram xerostomia, causada por uma redução absoluta do fluxo salivar. A cintigrafia é uma técnica que avalia a função glandular através da injeção intravenosa de contrastes, indivíduos diabéticos tipo 2 foram submetidos a

esse teste e os resultados mostraram uma anormalidade na produção de saliva e na sua taxa de secreção (LIN et al., 2002)

Considerando que as funções de síntese e secreção de saliva nas glândulas salivares são mediadas pela estimulação do sistema nervoso autônomo, alguns estudos avaliaram a influência do diabetes na produção de neurotransmissores, bem como na sensibilidade dos receptores simpático e parassimpático. Um modelo de rato diabético do tipo 2 apresentou uma diminuição na síntese e secreção de noradrenalina em parótida e submandibular, além disso, o fluxo salivar em resposta a estimulação de receptores adrenérgicos também sofreu uma redução comparada com o controle, o que sugere um comprometimento da transmissão simpática em glândulas salivares (VATTA et al., 2002). Há outros relatos que mostram que a redução do fluxo salivar pode estar associada a uma diminuição da sensibilidade de receptores muscarínicos em decorrência do diabetes (WATANABE; YAMAGISHI-WANG; KAWAGUCHI, 2001). Além de alteração em receptores do sistema nervoso autônomo, o diabetes afeta a via de sinalização desencadeada pela estimulação desses receptores. Há relatos do aumento na expressão de PKC em glândulas salivares de camundongo diabéticos não obesos (NOD Mouse) num curto período de tempo (TENSING et al., 2005). Num longo prazo, o estímulo da expressão de PKC poderia levar a um feed-back negativo, com comprometimento da síntese protéica em glândulas salivares. Um estudo da vascularização em glândula submandibular de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina mostrou uma diminuição da vasodilatação e nenhuma alteração da vasoconstrição estimulada por impulsos simpáticos (ANDERSON; GARRETT, 2004). Esses resultados acima relatados apontam uma possível neuropatia e microangiopatia manifestada em decorrência do diabetes.

Aspectos estruturais da regulação hormonal das glândulas salivares foram abordados (GARRET; EKSTRÖM; ANDERSON, 1998; HIGH; SUTTON; HOPPER, 1985; REUTERVING et al., 1987) com particular enfoque no diabetes experimental. As principais alterações histológicas apresentadas pelas glândulas salivares de diabéticos são diminuição no número de grânulos de secreção salivar, acúmulo de gotículas de gordura nas células acinares de parótida e submandibular e uma alteração na proporção celular. O acúmulo de gordura nas glândulas salivares tem sido suportado por três conjecturas: Primeira, um aumento de lipídeos como fonte alternativa de obtenção de energia; segunda, uma endocitose não específica decorrente da elevação da concentração de ácidos graxos livres circulante; terceira, uma redução na formação dos grânulos de secreção salivar e da utilização de gorduras que participam da composição de suas membranas contribuiriam para o aumento de gordura intracelular. Além disso, há uma alteração na proporção de ácidos graxos nas glândulas salivares de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. O diabetes tipo 1 acarreta perda de peso corpóreo, porém seu efeito sobre o peso glandular é contraditório. Há uma hipótese da insuficiência insulínica exercer efeitos diretos e indiretos sobre a perda de peso das glândulas salivares, ou seja, pelo comprometimento do metabolismo energético glandular ou pela diminuição dos níveis de hormônio de crescimento, respectivamente (GARRET; EKSTRÖM; ANDERSON, 1998).

Como citado anteriormente, as complicações tardias degenerativas apresentadas por indivíduos diabéticos podem ser desencadeadas pelo desequilíbrio entre o sistema antioxidante e a produção de radicais livre, como superóxidos e peróxidos. De acordo com alguns autores (NOGUEIRA et al., 2005), a glândula submandibular de ratos diabéticos apresenta um aumento da concentração de glutatona reduzida e

oxidada e uma redução na atividade da glutathione peroxidase, enquanto que a parótida apresenta um aumento da catalase. Além disso, há uma correlação positiva entre a concentração de malonaldeído na submandibular e a glicemia, um indicativo de peroxidação lipídica de glândulas salivares de ratos diabéticos.

O diabetes causa uma alteração no metabolismo de carboidratos no fígado e musculatura esquelética (FRANK; FROMM 1986; LIBAL-WEKSLER et al., 2001) com reflexos também em tecidos periféricos como as glândulas salivares. Após 30 dias da indução do diabetes se observa uma diminuição da atividade da hexoquinase na porção solúvel e ligada à mitocôndria de submandibular, enquanto que a glândula parótida apresentou resultados inversos (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005). Embora o diabetes comprometa o armazenamento de glicogênio hepático e muscular, em glândulas salivares esse resultado foi contrário, com aumento da concentração de glicogênio e da atividade da glicogênio sintase, bem como uma redução da glicogênio fosforilase (NICOLAU et al., 2005).

Há muitos estudos que mostram alterações em glândulas salivares de animais ou humanos diabéticos, como por exemplo pela avaliação do fluxo salivar, análise estrutural, sensibilidade de receptores adrenérgicos ou colinérgicos, a resposta à estimulação autonômica, metabolismo energético. Esses resultados são indicativos que levam a pensar que essa enfermidade poderia acarretar uma alteração da composição protéica tanto de glândulas salivares quanto no seu produto de secreção. Porém, os relatos presentes na literatura não apontam um consenso e sim resultados conflitantes que variam de acordo com o parâmetro estudado ou a metodologia empregada.

Há uma série de estudos sobre a atividade da amilase, da peroxidase e da quantidade de proteínas na saliva e nas glândulas de ratos diabéticos. Estas

proteínas têm sido estudadas como marcadores protéicos de atividade glandular. Os trabalhos apresentados na literatura mostram resultados controversos, com diminuição, aumento ou nenhuma diferença na atividade da amilase e peroxidase e concentração de proteína total em glândulas salivares e saliva de animais e indivíduos diabéticos (ANDERSON, 1983; ANDERSON; SHAPIRO, 1979; ANDERSON; SHAPIRO, 1980; ANDERSON et al., 1989; DODDS; DODDS, 1997; DODDS; YEH; JOHNSON, 2000; LIN et al., 2002).

Quanto à concentração de ácido siálico em submandibular de diabéticos, os resultados também são conflitantes. Existem relatos que mostram aumento (NICOLAU; ROSA; FAVA-DE-MORAES, 1969) diminuição (MICKELBOROUGH, 1967) ou nenhuma diferença significativa na quantidade de ácido siálico (ZEBROWSKI; BRIMMER, 1978) na glândula submandibular.

2.3 Diabetes e tungstato de sódio

A investigação de compostos com atividade antidiabética tem sido intensa durante estes últimos anos. Entre estes compostos tem sido descrito um conjunto de oxiânions derivados do vanádio, selênio, molibdênio e tungstênio que têm efeitos sobre o metabolismo energético e apresentam a vantagem de serem administrados via oral (BECKER et al., 1996; BERG et al., 1995; LI et al., 1995; MCNEILL; DELGATTY; BATTELL, 1991).

As ações antidiabéticas do tungstato tem sido amplamente descritas na literatura em diferentes modelos animais de diabetes tipo 1 (ratos STZ) e de tipo 2 (ratos nSTZ e ZDF).

O modelo de diabetes tipo 1 utilizado, ratos STZ, se obtém mediante a injeção de estreptozotocina em ratos Wistar adultos. Os tratamentos com tungstato de sódio tem sido realizados entre 15 dias e 8 meses com resultados como a normalização da glicemia e a restauração do metabolismo hepático da glicose mediante o aumento na fosforilação da glicose e de enzimas chaves e metabólitos da via glicolítica, assim como o restabelecimento do metabolismo do glicogênio hepático (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 2001).

Recentemente foi demonstrado que num modelo de diabetes, ratos nSTZ, o tratamento com tungstato estimula a regeneração de células beta do pâncreas, o que resulta num aumento na insulinemia. Este resultado é de um grande potencial já que abre a possibilidade de uma terapia que permita a cura desta doença (FERNANDEZ-ALVAREZ et al., 2004).

O diabete está freqüentemente associado à maioria dos casos com obesidade. Os estudos dos efeitos do tratamento com tungstato de sódio em animais com diabetes tipo 2 associado à obesidade, ratos ZDF (Zucker Diabetic Fatty Rat), mostram uma importante redução na glicemia, que parece estar relacionada por um lado com o aumento no fluxo glicolítico, devido ao aumento na atividade da glicoquinase e da piruvato quinase, e por outro lado com o aumento do conteúdo de glicogênio hepático (MUNOZ et al., 2001). No metabolismo de lipídeos, o tratamento induz o aumento da atividade da ácido graxo sintase e uma redução nos níveis de triglicérides circulantes, o qual sugere que o tratamento com tungstato de sódio poderia reduzir a lipotoxicidade. Por outro lado, neste modelo experimental o

tungstato de sódio não produziu um aumento na estimulação da secreção de insulina, mas um aumento na captação e fosforilação de glicose (MUNOZ et al., 2001). Num modelo de obesidade utilizando animais que se alimentaram com dieta de cafeteria, a administração crônica de tungstato de sódio causou uma diminuição do peso corporal através do aumento da termogênese e oxidação lipídica, sem alterar a ingestão líquida e calórica, além disso, reduziu a adiposidade, melhorou a sensibilidade à insulina e controlou a hiperinsulinemia (CLARET et al., 2005). O tungstato também estimula o transporte intracelular de glicose nos adipócitos isolados, que é potencializado na presença de H_2O_2 (GOTO et al., 1992).

O mecanismo de ação do tungstato de sódio não está completamente esclarecido, mas é sabido que além de atuar no metabolismo de lipídeos, glicose e glicogênio, sua administração aumenta a massa de células beta no pâncreas e a concentração de Glut-4 em diafragma de ratos induzidos por estreptozotocina (GIRON et al., 2003). Além disso, seu potencial hipoglicemiante pode estar relacionado com a inibição da glicose-6-fosfatase, uma importante enzima que atua na homeostase da glicose (FOSTER et al., 1998). Finalmente, há uma série de dados que implicam às proteínas quinases ERK1/2 no metabolismo estimulatório da deposição de glicogênio induzida por tungstato (FOSTER et al., 1998).

Muitos trabalhos apontam o tungstato como uma alternativa de contorno dos inconvenientes causados pelo diabetes, por exemplo pelo restabelecimento do metabolismo de carboidratos e lipídeos, da síntese de insulina, do número de células pancreáticas e outras. Porém, há algumas desvantagens que devem ser ponderadas. A administração de tungstato de sódio potencializa a perda de peso corpóreo causada pelo diabetes, o que pode ser um grande problema para o diabetes tipo 1 e uma alternativa de controle da obesidade relacionada com o tipo 2. Poucos

estudos foram desenvolvidos sobre a toxicidade do tungstato de sódio e não há um modelo biológico de sua distribuição e retenção no corpo humano. Os modelos animais de estudo apontam um acúmulo de tungstato nos rins, fígado e grande parte nos ossos, substituindo os íons fosfato (LEGGETT, 1997). A dose de tungstato de sódio administrada nos trabalhos presente na literatura (2mg/ml) não causou efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos nos animais, sendo utilizadas as concentrações de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) como referências no fígado e a concentração de creatinina e uréia nos rins (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 1997). Porém, a administração de tungstato causou uma pequena diminuição na longevidade de ratos, além de efeitos embriológicos e aumento da reabsorção de fetos em ratas prenhas (DOMINGO, 2002). Os sinais clínicos apresentados por animais submetidos ao tratamento com tungstato de sódio são diminuição da atividade motora e tônus muscular, anorexia, prostração, dispnéia, fadiga, caquexia, entre outros (DOMINGO, 2002).

3 PROPOSIÇÃO

Não há relatos da influência do tungstato de sódio em glândulas salivares de animais diabéticos. Assim, abordamos diferentes aspectos das glândulas salivares de ratas diabéticas induzidas por estreptozotocina e submetidas ao tratamento com tungstato de sódio, administrado na água de consumo numa dose de 2 mg/ml, por um período de 6 semanas. Os aspectos abordados foram o metabolismo de carboidratos, parâmetros da via de secreção de proteínas e a composição protéica de glândulas e saliva.

No metabolismo de carboidratos de parótida e submandibular estudamos a concentração de glicogênio e alguns parâmetros da via glicolítica através da determinação da atividade da hexoquinase, fosfofrutoquinase-1 e piruvato quinase. Estudamos também a atividade enzimática da lactato desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase, um indicativo do metabolismo anaeróbico e da via das pentoses, respectivamente.

A concentração de proteína total e de ácido siálico livre e total e a atividade da amilase e peroxidase foram determinadas no estudo da composição protéica de parótida, submandibular e saliva de ratas diabéticas tratadas com tungstato de sódio. Além disso, estudamos a expressão de PKC por western blot, como um parâmetro da via de secreção de proteínas desencadeadas pela estimulação de receptores muscarínicos colinérgicos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais e indução do diabetes

No presente estudo foram utilizadas ratas da raça Wistar, pesando aproximadamente 180-200g, distribuídas em gaiolas individuais, com livre acesso à água e alimento ao longo de todo período experimental. Os animais foram divididos em 4 grupos: controle (C), controle tratado (CT), diabético (D) e diabético tratado (DT).

A indução de diabetes foi realizada pela injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60mg/kg peso corporal) dissolvida em tampão citrato 0,1M pH 4,5, em ratas mantidas em jejum por aproximadamente 15 horas. Os animais controles receberam uma dose, correspondente à dos experimentais, de citrato de sódio 0,1M pH 4,5. Foram considerados como diabéticos os animais que apresentaram a glicemia superior a 300 mg de glicose/ dL de sangue. Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP (Anexo A).

4.2 Tratamento com tungstato de sódio

O tungstato de sódio foi dissolvido em água destilada numa concentração de 2mg/ml, com livre acesso pelos animais. O tratamento consistiu na administração

aos animais do grupo controle (CT) e diabético (DT) tratados e foi iniciado no momento da determinação da glicemia inicial. Os quatro grupos estudados foram submetidos a diferentes tempos de tratamento com tungstato de sódio e sacrificados por traumatismo craniano no final de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas de administração. Durante o período experimental, os consumos de água e alimento foram monitorados.

4.3 Obtenção das amostras

4.3.1 Coleta da saliva

Para a realização da coleta de saliva total, com horário padronizado no período da manhã, para minimizar os efeitos do ritmo circadiano, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral 165 mg/Kg de peso e barbital sódico 16,4 mg/Kg de peso. A saliva foi coletada num bequer mergulhado em gelo picado. A salivação foi estimulada através da aplicação intraperitoneal de nitrato de pilocarpina (7,5 mg/Kg de peso), um agonista não seletivo de receptores muscarínicos, e pela aplicação de isoproterenol HCL, um agonista de receptores β -adrenérgico (5,0 mg/Kg de peso). A saliva foi centrifugada a 27000g por 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação das atividades da amilase e da peroxidase, o conteúdo de ácido siálico livre e total e a concentração de proteína total.

4.3.2 Obtenção das glândulas parótida e submandibular

Após o sacrifício, as glândulas salivares foram imediatamente removidas, limpas de tecido aderente, prensadas e congeladas entre placa de alumínio previamente mantida em gelo seco e permaneceram no freezer -80°C . No momento do uso, as glândulas ainda congeladas foram pesadas, homogeneizadas no mesmo tampão utilizado em cada experimento e centrifugadas a 15000g por 15 minutos. Com o sobrenadante das amostras das glândulas salivares foram analisados os mesmos parâmetros da saliva, bem como o conteúdo de glicogênio e a atividade enzimática das enzimas da via glicolítica.

4.4 Análises

4.4.1 Determinação da glicemia

A glicemia em jejum foi determinada das amostras de sangue obtidas da cauda por glicosímetro Accu-Chek Advantage da Roche®, 72 horas da injeção de estreptozotocina para confirmar o diagnóstico de diabetes e no momento do sacrifício.

4.4.2 Determinação de Proteína

A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Neste método, as proteínas presentes nas amostras de saliva ou nas glândulas salivares reagem com o cobre em meio alcalino formando um complexo. Os aminoácidos fenólicos presentes neste complexo apresentam pouca variação em sua estrutura primária e são reduzidos pelo reativo de folin-ciocalteu, resultando uma coloração azulada. A intensidade de coloração foi determinada por espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm. Foi usado como padrão uma curva de referência com uma solução de albumina 0,5 mg/L

4.4.3 Determinação da atividade enzimática da amilase

A atividade enzimática da amilase foi determinada pelo método descrito por (FISHER; STEIN, 1961). Uma mistura de amido solúvel 1%, de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,0) e de saliva ou do homogenado das glândulas foi incubada a 37°C por 5 minutos para que a amilase presente nas amostras promova a hidrólise do polissacarídeo. Depois da incubação, foi acrescentada a esta mescla uma alíquota da solução alcalina de ácido dinitrosalicílico (DNS) e fervida a 100°C por 5 minutos para paralisar a reação. A coloração causada pelo DNS foi medida por

espectrofotometria 530 nm. Foi usado como padrão uma curva de referência com uma solução de maltose 1 mg/mL.

4.4.4 Determinação da atividade enzimática da peroxidase

A atividade enzimática da peroxidase foi determinada pelo método de (ANDERSON, 1986) e (CHANDRA; DAS; DATTA, 1977). Este método consiste na medida da variação da absorbância 460nm, pelo espectofotômetro, de uma mistura de amostras de saliva ou do homogenado das glândulas, de tampão fosfato 10mM, o-dionisidina 10 mM e H_2O_2 2,1 mM. Foi usado como padrão uma curva de referência com uma solução de lactoperoxidase 1mg/mL com diluição 1:25.

4.4.5 Determinação de ácido siálico

A concentração do ácido siálico foi determinada pela combinação de métodos de (AMINOFF, 1961; SKOZA; MOHOS, 1976), usando uma solução de ácido N-acetil-neuramínico como curva padrão. Para a determinação do ácido siálico total, as amostras de saliva ou do sobrenadante de glândulas foram pré-tratadas através da hidrólise da amostra pela incubação em 0,1N H_2SO_4 a 80°C por uma hora, para ocorrer a separação dos derivados do ácido neuramínico presentes nas cadeias proteicas das glicoproteínas. O conteúdo de ácido siálico foi determinado pela leitura

espectofotométrica a 549 nm de alíquotas resultante da mistura de ácido periódico 25 nm, arsenito de sódio 2%, ácido tiobarbitúrico 0,1M pH 9,0, dimetil sulfoxido e amostras de saliva ou do homogenado das glândulas.

4.4.6 Determinação da concentração de glicogênio

A determinação do glicogênio das glândulas salivares foi realizada pelo método proposto por (SINGH; SINGH; VENKITASUBRAMANIAN, 1976). As glândulas salivares foram pesadas e digeridas em KOH 30% a 100°C por 30 minutos. As amostras foram tratadas com solução saturada de Na₂SO₄ e metanol a 95% para proporcionar a precipitação do glicogênio e posteriormente centrifugadas a 3020g por 20 minutos. O precipitado foi tratado com ácido tricloroacético 5%, responsável pela separação da fração proteica das amostras. As amostras foram lavadas com metanol contendo 0,1 % de Cloreto de Lítio, metanol absoluto, metanol-éter etílico (3:1), éter etílico. Após a digestão do tecido, precipitação e lavagem do glicogênio, foi acrescentada às amostras uma solução de antrona 0,2% dissolvida em ácido sulfúrico. O reagente de antrona é um composto usado para em determinações colorimétricas de polissacarídeos em fluidos corpóreos. Foi utilizado como padrão uma curva com solução de glicose.

4.4.7 Determinação das enzimas hexoquinase (HK), fosfrutoquinase 1 (PFK-1), piruvato quinase (PK), e glicose-6-desidrogenase (G6PD), lactato desidrogenase (LDH)

As glândulas salivares foram homogeneizadas a 10% em meio contendo tampão 50mM imidazol pH7.0, 2mM EDTA e 1mM mercaptoetanol. O homogenado foi centrifugado a 12100g por 20 minutos e utilizamos o sobrenadante para as determinações. A atividade das enzimas da via glicolítica acima citada são determinadas de acordo com o método descrito por (FERREIRA; NICOLAU, 1987). As análises enzimáticas foram determinadas pela leitura por espectrofotômetro Beckman DU68 da variação da absorbância a 340nm por um período de 5 minutos, causada pela redução de NADP ou oxidação do NADH, utilizando cubeta de quartzo com 1cm de comprimento de passagem de luz. Para a atividade enzimática da HK foi acrescentada numa cubeta uma alíquota do meio de reação (Imidazol 0.1M, MgCl₂ 0.2M, ATP 0.1M, NADP, G-6DP e água destilada), do homogenado das glândulas salivares e do iniciador da reação (solução de glicose 0,1M). A atividade enzimática da PFK-1 foi determinada pela mistura na cubeta de uma alíquota da amostra e do meio de reação contendo tampão Hepes 100 mM pH8.0, KCl 2mM, MgCl₂ 325 mM, NH₄Cl 50 mM, KH₂PO₄ 50 mM, NADH 6mM, AMP 2 mM, aldolase, G-D-H, Tim, PGI, F6P, G6P, ATP 30mM. A análise enzimática da PK foi determinada a partir de uma mistura do meio de reação (Imidazol 0,1M, MgCl₂, 2M, KCl 1,0M, ADP 0,1M, NADH, PEP), de uma alíquota da amostra e de lactato desidrogenase, iniciador da reação. A atividade enzimática da G6PD foi determinada a partir de uma mistura do meio de reação (tampão Tris-HCl 0.1M, MgCL₂ e NADP), de uma

alíquota da amostra e de glicose-6-fosfato, iniciador da reação. A atividade enzimática da LDH foi determinada a partir de uma mistura do meio de reação (K_2HPO_4 50mM, KH_2PO_4 0,63mM, Piruvato de Na, pH 7.5), de uma alíquota da amostra e de NADH, iniciador da reação.

4.4.8 Western Blot da proteína quinase C (PKC)

O estudo da PKC foi realizado no Laboratório de Engenharia Metabólica e Terapia do Diabetes do Parc Científic de Barcelona da Universidade de Barcelona Espanha durante o período estágio sanduíche no exterior. Para o estudo da PKC em glândulas salivares, foram utilizados os quatro grupos após um curto período de tratamento (1 semana). As amostras foram pesadas e homogeneizadas ainda congeladas em tampão contendo Tris 1M pH7.4, NaCl 5M, ortovanadato 0.2M, NaF 1M, PPI 100mM, triton 20%, SDS 10% e EGTA 0,2%, 2.5 μ l de ácido okadaico 100 μ M, 10 μ L de aprotinina, 10 μ L de leupeptina, 10 μ L aprotinina, 10 μ L de pepstatina. As amostras foram centrifugadas a 4°C a 13000g por 15 minutos e o sobrenadante foi dissolvido em tampão de ruptura (0.5M Tris-HCl, SDS 10%, glicerol 20%, mercaptoetanol 2%, ditioneitol (DTT) 0.2mM, azul de bromofenol, 0.03mM) e fervido por 5 minutos para a denaturação das proteínas. Foi realizada uma eletroforese num gel de poliacrilamida a 8% com as amostras dos 4 grupos estudados (30 μ g da amostra), usando como controle positivo células de ovários de Hamsters que expressam receptores de insulina (CHOIR). O gel foi transferido para membrana de nitrocelulose a 100V por 40 minutos. A membrana foi bloqueada

através da incubação por 30 minutos em solução de albumina 3% dissolvida em tampão fosfato de sódio 1% e Tween20 0.1%. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (anti-rabbit) dissolvido na mesma solução de bloqueio. Foram utilizados 2 tipos de anticorpos primários, um que reconhece isoformas desfosforiladas de PKC, denominado PKC-total (referência 9371 da Cell Signaling®) e outro que reconhece as isoformas ativas fosforiladas de PKC, denominada PKC-clássica (referência 9371 da Cell Signaling®). Foi utilizado o kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, composto por antígeno conjugado com horseradish peroxidase, uma solução que reage com o anticorpo secundário formando uma luminescência capaz de sensibilizar um filme fotográfico.

4.5 Análise estatística

A análise estatística entre os grupos estudados foi realizada pela análise de variância e como teste de contraste foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A média e o desvio padrão das amostras estão representadas nas figuras sob a forma de pontos e barras, respectivamente. As diferenças estatisticamente significantes estão representadas por letras diferentes entre os grupos estudados na mesma semana.

5 RESULTADOS

A figura 5.1 representa a média dos valores da glicemia final (mg/dL) de ratas controle e diabéticas, tratadas ou não com tungstato de sódio, num período de 6 semanas. Os animais diabéticos incluídos nos grupos estudados apresentaram uma glicemia inicial superior a 300 mg/dl de sangue. Em nossas condições experimentais, os animais diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentaram uma glicemia superior aos animais do grupo controle, com um aumento que variou de 430 a 650%. Com exceção da primeira e terceira semana, foi observado que o tungstato de sódio causou uma redução da glicose sanguínea dos animais diabéticos tratados (DT) quando comparados com o grupo diabético sem o tratamento (D) em todos os tempos experimentais, com uma variação de 44 a 57% e alcançando níveis próximos do controle, como na quinta semana. Embora o tungstato tenha apresentado um efeito hipoglicemiante, a glicemia do grupo diabético submetido ao tratamento apresentou uma variação ao longo das semanas estudadas. O tratamento com tungstato de sódio não alterou a glicemia dos animais do grupo controle.

A figura 5.2 representa a média dos valores do peso corporal final em gramas avaliados no momento do sacrifício, após decorrer 6 semanas. Os animais diabéticos apresentaram redução da massa corporal em todos os tempos experimentais, chegando a uma perda de aproximadamente 30% do peso corporal. O tratamento com tungstato de sódio potencializou o efeito causado pela injeção de estreptozotocina em todos os tempos experimentais, exceto na terceira semana, com valores que alcançaram cerca de 55% de perda comparado com o grupo

controle. O grupo controle tratado não sofreu qualquer alteração no peso corporal após a administração de tungstato de sódio.

As figuras 5.3 e 5.4 representam a média dos valores de peso da glândula parótida e submandibular, respectivamente. O peso glandular foi expresso em peso absoluto (mg) e relativo de parótida e submandibular. O peso relativo glandular (PGR) foi determinado de usando a seguinte fórmula: $PGR = (\text{Peso glândula (g)} \times \text{Peso corporal (g)}) \times 100$.

A glândula parótida sofreu uma perda de peso absoluto na terceira e quarta semana, mas de um modo geral, as diferenças no peso absoluto de parótida foram pouco significativas entre os grupos estudados, resultados mostrados na figura 5.3. O peso relativo de parótida foi maior no grupo diabético na maioria dos tempos experimentais, esse aumento foi causado por uma diminuição do peso corporal. O tratamento com tungstato de sódio causou efeitos não significativos no peso absoluto e relativo de parótida, exceto na quarta semana. Os resultados de peso absoluto e relativo de submandibular foram bem distintos dos da glândula parótida (figura 5.4). A glândula submandibular de ratos diabéticos sofreu uma redução de peso absoluto a partir da segunda semana experimental, com uma variação de 20 a 30% comparada com o grupo controle. O tratamento com tungstato de sódio potencializou a perda de peso absoluto de submandibular, com uma variação ente 40 e 50% comparada como grupo controle. O efeito do tungstato de sódio no grupo controle tratado foi pouco significativo. Não houve diferenças significativas no peso relativo de glândula submandibular.

A figura 5.5 representa a média dos valores da ingestão alimentar e líquida dos grupos estudados. Os animais diabéticos apresentaram maior consumo de ração (polifagia) e maior consumo de água (polidipsia), confirmadas pelo aumento

no consumo de água e comida em todos os tempos experimentais estudados. O tratamento com tungstato de sódio causou uma redução na ingestão líquida nos animais diabéticos, que se manteve estável ao longo das semanas estudadas. A ingestão alimentar dos animais diabéticos tratados apresentou uma redução gradual no decorrer das semanas, alcançando níveis próximos do grupo controle. Não houve efeitos significativos do tungstato de sódio sob a ingestão líquida e alimentar no grupo controle tratado.

A figura 5.6 representa a variação da concentração de glicogênio de glândula parótida e submandibular, ao longo de 6 semanas. As glândulas parótida e submandibular dos animais diabéticos sofreram um aumento na concentração de glicogênio nas semanas iniciais do experimento, enquanto que nas semanas finais não houve diferenças significativas comparadas com o grupo controle. Na glândula submandibular dos animais diabéticos também houve um acúmulo de glicogênio, representado por uma concentração maior que a do grupo controle por um período experimental mais longo comparado com a glândula parótida. Embora a figura mostre uma tendência do tungstato de potencializar o armazenamento de glicogênio em parótida de diabéticos tratados, esses resultados não foram estatisticamente significantes devido ao grande desvio padrão. Além disso, esse efeito não se reproduziu em submandibular. Não houve diferenças entre os grupos controle e controle tratado na concentração de glicogênio de parótida e submandibular.

As figuras 5.7 e 5.8 representam os valores da atividade enzimática da hexoquinase expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg prot) e unidade por glândula (U/glândula) de parótida e submandibular, respectivamente, durante o período experimentado. A atividade da hexoquinase de parótida apresentou uma variação ao longo da semana em todos os grupos estudados em U/mg prot e nos

grupos diabéticos e diabéticos tratados em U/glândula. A glândula parótida dos animais diabéticos apresentaram um aumento da atividade de hexoquinase em algumas semanas, especialmente nas semanas iniciais quando expressa em U/glândula. O tratamento com tungstato de sódio não produziu efeitos significantes na HK de parótida nos grupos controle e diabéticos tratados em ambas as unidades apresentadas. As variações apresentadas pela glândula submandibular se deram nas semanas iniciais do experimento, especialmente na unidade U/mg prot. O grupo diabético apresentou uma diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo controle apenas na terceira semana e o tungstato de sódio apresentou um efeito estimulante da HK de submandibular apenas na primeira semana em U/mg prot.

As figuras 5.9 e 5.10 representam os valores da atividade enzimática da fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg prot) e unidade por glândula (U/glândula) de parótida e submandibular, respectivamente. A glândula parótida dos animais diabéticos e diabéticos tratados apresentaram um aumento da atividade de PFK-1 no início do experimento com pico na terceira e quarta semana, respectivamente (U/mg prot). Não houve diferença na atividade da PFK-1 entre os grupos diabéticos e diabéticos tratados, exceto na última semana devido a um aumento da atividade da enzima no grupo diabético em ambas as unidades apresentadas. A atividade da PFK-1 da glândula submandibular não sofreu grandes variações entre os grupos estudados, com exceção da segunda semana na unidade U/glândula.

As figuras 5.11 e 5.12 representam os valores da atividade enzimática da piruvato quinase (PK) expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg prot) e unidade por glândula (U/glândula) de parótida e submandibular, respectivamente.

A glândula parótida apresentou diferenças entre os grupos estudados apenas na primeira e na quinta semana nas unidades U/mg prot e U/glândula, respectivamente. O grupo diabético apresentou uma redução da atividade da enzima, potencializada pelo tratamento com tungstato de sódio. A glândula submandibular do grupo diabético apresentou uma redução na atividade da enzima na segunda semana comparada com o grupo controle (U/mg prot). Porém, na quarta e quinta semana esse evento foi contrário devido a uma redução no grupo controle. As diferenças apresentadas na unidade U/glândula foram conseqüências da variação da atividade da enzima na submandibular dos grupos controle e controle tratado.

As figuras 5.13 e 5.14 representam os valores da atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg prot) e unidade por glândula (U/glândula) de parótida e submandibular, respectivamente. Os resultados mostram aumento na atividade específica dessa enzima na glândula parótida dos animais diabéticos na segunda, terceira e quarta semana após a injeção de STZ. Os dados para a atividade específica dos animais tratados com tungstato de sódio apresentaram efeito estimulante da enzima apenas na segunda semana experimental. A glândula submandibular apresentou diferença entre os grupos estudados apenas na segunda semana experimental em ambas unidades apresentadas, com uma estimulação da atividade da enzima no grupo diabético tratado.

As figuras 5.15 e 5.16 representam os valores da atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH) expressos em unidade por miligrama de proteína (U/mg prot) e unidade por glândula (U/glândula) de parótida e submandibular, respectivamente. A glândula parótida do grupo diabético apresentou uma atividade enzimática reduzida na primeira semana do estudo (U/mg prot e U/glândula). Porém,

no decorrer do tempo ocorreu uma estimulação com pico de atividade na terceira semana (apenas em U/mg prot), assim, as diferenças com o grupo controle ocorreram apenas na primeira e segunda semana. De modo geral, os resultados do grupo diabético tratado acompanharam os do grupo diabético. Os resultados da atividade enzimática da G6PD de submandibular foram semelhantes aos de parótida na primeira semana do estudo em ambas as unidades. Entretanto, o grupo diabético tratado apresentou uma estimulação na terceira semana na unidade U/glândula.

A figura 5.17 representa os valores da concentração de proteína (mg proteína/mg tecido) das glândulas parótida e submandibular dos grupos estudados. A glândula parótida dos animais diabéticos apresentou uma redução na concentração de proteínas na segunda semana estudada, enquanto que a diferença na submandibular foi um aumento na quinta semana. O tratamento com tungstato de sódio aumentou a concentração de proteínas na primeira e terceira semana de parótida e na primeira de submandibular de animais diabéticos tratados. O tungstato de sódio causou um aumento na concentração de proteínas no grupo controle na glândula parótida (terceira semana) e na submandibular (segunda e quinta semana).

A figura 5.18 representa os valores da atividade enzimática da amilase (U/mg prot) das glândulas parótidas e submandibular. Nossos resultados mostraram que a parótida possui uma atividade da amilase muito maior que a da submandibular, o que era esperado de acordo com a literatura. A glândula parótida do grupo diabético apresentou um aumento da atividade da enzima nas semanas iniciais do tratamento, sendo normalizada no final de experimento. O tungstato de sódio potencializou o acúmulo de proteína no grupo diabético tratado na segunda semana experimental. A glândula submandibular não apresentou diferenças na concentração de proteínas

entre os grupos controle e diabéticos. Além disso, todos os grupos estudados sofreram variação da atividade da amilase ao longo das semanas.

A figura 5.19 representa os valores da atividade enzimática de peroxidase das glândulas parótida e submandibular. Assim como aconteceu com a atividade da amilase, a glândula parótida sofreu um aumento da peroxidase no grupo diabético em algumas semanas das semanas estudadas, com um pico de atividade na segunda semana. Em relação à glândula submandibular, nas semanas que ocorreram diferenças estatisticamente significantes a tendência foi um aumento da atividade no grupo diabético, com exceção da terceira semana devido um aumento excessivo da atividade no grupo controle. O tungstato de sódio manteve a atividade da peroxidase num nível próximo do grupo controle na maioria das semanas estudadas, tanto de parótida quanto de submandibular.

As figuras 5.20 e 5.21 representam os valores da concentração de ácido siálico de parótida e submandibular, respectivamente. Os valores apresentados em cada figura representam a média da concentração de ácido siálico livre e total em μg Nana/ mg proteína. A concentração de ácido siálico total de parótida do grupo diabético apresentou um aumento nas semanas iniciais estudadas, com um pico na segunda semana e queda nas semanas finais do experimento. Este evento também passou com outros parâmetros estudados de parótida de ratos diabéticos, por exemplo, com a atividade da amilase e peroxidase. Apesar desse aumento, as diferenças com o grupo controle se deram apenas na segunda semana e na sexta, devido à variação no grupo controle. Assim como aconteceu com a concentração de ácido siálico total de parótida, o ácido siálico livre do grupo diabético também sofreu um pico nas semanas iniciais dessa glândula. A glândula submandibular não apresentou diferenças na concentração de ácido siálico total e livre comparando

grupo controle e diabético, com exceção da sexta semana por uma variação no grupo controle. O tratamento com tungstato de sódio não apresentou grandes efeitos sobre a concentração de ácido siálico total e livre de parótida e submandibular, com apenas algumas diferenças. Na terceira semana em glândula parótida, o grupo diabético tratado apresentou uma redução na concentração de ácido siálico total comparado com o grupo diabético, enquanto que o grupo controle tratado apresentou uma redução na concentração de ácido siálico livre comparado com o grupo controle.

De modo geral, as modificações dos parâmetros salivares estudados em parótida e submandibular apareceram nas semanas iniciais do experimento, com uma tendência à normalização no final de 6 semanas. Assim, estudamos a concentração de proteína total e a atividade enzimática da amilase e peroxidase em saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol dos grupos estudados no período em que ocorreram as principais alterações nas glândulas salivares, ou seja, num período de até quatro semanas experimentais. Nossos resultados em glândulas salivares foram contrários dos que se passaram em saliva.

A figura 5.22 representa os valores da concentração de proteína total (mg/ml) da saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol nos quatro grupos estudados. Em glândula parótida e submandibular foram observadas uma redução ou nenhuma diferença estatisticamente significativa na concentração de proteína total do grupo diabético nas semanas iniciais do experimento, respectivamente. Porém, em saliva os valores são bem diferentes, com um aumento da concentração de proteínas no grupo diabético comparado com o grupo controle. O tratamento com tungstato de sódio potencializou o aumento da concentração de proteína total em saliva dos grupos controle e diabético tratados em algumas semanas estudadas.

As figuras 5.23 e 5.24 representam os valores da atividade enzimática da amilase (U/mg prot) e peroxidase ($\mu\text{g/mg prot}$) da saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol nos quatro grupos estudados. Os resultados mostraram que não houve diferenças significantes entre os grupos controle e diabético, porém o tratamento com tungstato de sódio causou uma redução na atividade da amilase do grupo controle e diabético submetidos ao tratamento, em todas as semanas estudadas. A atividade da peroxidase do grupo diabético apresentou uma redução na primeira semana quando comparada ao controle, porém nenhuma diferença foi encontrada no decorrer do experimento. Não houve efeitos significativos do tungstato de sódio sob a atividade de peroxidase nos grupos tratados, com exceção do grupo diabético na segunda semana, que apresentou uma redução de sua atividade.

As figuras 5.25 e 5.26 representam os resultados do estudo da proteína quinase C (PKC) em glândula submandibular e parótida, respectivamente, após uma semana de tratamento com tungstato de sódio. As imagens representam os quatro grupos estudados comparados com um controle positivo de células de CHOIR, sendo usados anticorpos que reconhecem as isoformas clássicas fosforiladas e portanto ativas da enzima, bem como anticorpos contra PKC total, que reconhecem isoformas não fosforiladas e portanto não ativas da enzima. Cada banda apresentada no resultado de western representa um animal diferente. A glândula submandibular do grupo diabético apresentou um aumento na expressão de PKC clássica, bem como também ocorreu o aparecimento de diferentes isoformas fosforiladas da enzima, especialmente o tipo alfa, esse subtipo foi bem marcado no padrão positivo de CHOIR. Alguns animais do grupo diabético apresentaram uma estimulação da expressão de PKC total, porém esse efeito não foi reproduzido em todos os animais. Além disso, o tungstato de sódio potencializou a expressão de

PKC clássica e total em submandibular do grupo diabético tratado. A glândula parótida não apresentou qualquer diferença entre os grupos estudados tanto no estudo da PKC clássica quanto na PKC total.

Figura 5.1- Média da glicemia (mg/dl) dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 15$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.2 – Média do peso corporal (gramas) dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.3 – Média do peso absoluto (mg) e relativo (g/g peso corporal.100) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.4 – Média do peso absoluto (mg) e relativo (g/g peso corporal.100) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente (8<n<12). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.5 – Média da ingestão alimentar e líquida ($\text{g} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g peso corporal}^{-1}$ e $\text{ml} \cdot \text{dia}^{-1} \cdot \text{g peso corporal}^{-1}$, respectivamente) dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT), por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.6 – Média da concentração de glicogênio ($\mu\text{g}/\text{mg tec}$) de parótida e submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.7 – Média da atividade enzimática de hexoquinase (U/mg prot e U/glandula) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.8 – Média da atividade enzimática de hexoquinase (U/mg prot e U/glândula) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.9 – Média da atividade enzimática de fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) (U/mg prot e U/glândula) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.10 – Média da atividade enzimática de fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) (U/mg prot e U/glândula) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.11 – Média da atividade enzimática de piruvato quinase (PK) (U/mg prot e U/glândula) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.12 – Média da atividade enzimática de piruvato quinase (PK) (U/mg prot e U/glândula) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.13 – Média da atividade enzimática de glicose-6-fosfato desidrogenase (U/mg prot e U/glândula) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.14 – Média da atividade enzimática de glicose-6-fosfato desidrogenase (U/mg prot e U/glândula) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.15 – Média da atividade enzimática de lactato desidrogenase (LDH) (U/mg prot e U/glândula) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.16 – Média da atividade enzimática de lactato desidrogenase (LDH) (U/mg prot e U/glândula) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 10$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.17 – Média da concentração de proteína total (mg prot/ mg tecido) de glândula parótida e submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente (8<n<12). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.18 – Média da atividade enzimática da amilase (U/mg prot) de glândula parótida e submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratados com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.19 – Média da atividade enzimática da peroxidase ($\mu\text{g/mg prot}$) de glândula parótida e submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratados com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.20 – Média da concentração de ácido siálico total e livre ($\mu\text{Nana/mg prot}$) de parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.21 – Média da concentração de ácido siálico total e livre ($\mu\text{Nana}/\text{mg prot}$) de submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratados com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 6 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.22 – Média da concentração de proteína total (mg/ml) de saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 4 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 34$). As diferenças estatisticamente significativas são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.23 – Média da atividade enzimática da amilase (U/mgprot) de saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 4 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Atividade de peroxidase salivar

Figura 5.24 – Média da atividade enzimática da peroxidase ($\mu\text{g}/\text{mgprot}$) de saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol dos grupos estudados controle (C), controle tratado com tungstato de sódio (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT) por um período de 4 semanas. Pontos e barras representam a média e desvio padrão, respectivamente ($8 < n < 12$). As diferenças estatisticamente significantes são representadas por letras diferentes, comparando grupos na mesma semana ($p \leq 0.05$)

Figura 5.25 - Expressão qualitativa da proteína quinase C (PKC) clássica (isoformas fosforiladas) e total (isoformas desfosforiladas) da glândula submandibular dos grupos estudados controle (C), controle tratado (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT), tendo como padrão positivo células CHOIR. Cada banda representa um animal diferente

Figura 5.26 - Expressão qualitativa da proteína quinase C (PKC) clássica (isoformas fosforiladas) e total (isoformas desfosforiladas) da glândula parótida dos grupos estudados controle (C), controle tratado (CT), diabético induzido por i.p. de STZ (D) e diabético induzido por i.p. de STZ tratado com tungstato de sódio (DT), tendo como padrão positivo células CHOIR. Cada banda representa um animal diferente

6 DISCUSSÃO

O diabetes é uma doença crônica, cuja prevalência vem aumentando nos últimos anos. Estudos apontam um crescimento próximo de 100% no número de indivíduos com a doença em todo o mundo até o ano de 2030 (WILD et al., 2004). Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de apresentar alternativas de tratamento profilático e terapêutico do diabetes, que incluem reeducação alimentar, atividades físicas e até mesmo um tratamento ortomolecular da doença através do equilíbrio nutricional, metabólico e enzimático com a administração de micronutrientes como aminoácidos, sais minerais, coenzimas, entre outros (MATSUMOTO, 1994).

Os compostos formados por tungstênio tem sido foco de investigação como uma alternativa de tratamento do diabetes por possuírem ação insulinomimética e serem administrado por via oral. O cátion W^{6+} não tem sido encontrado na forma isolada, mas sempre ligado a uma estrutura farmaceuticamente aceitável. Esta estrutura pode ser formada por compostos inorgânicos como peróxidos, óxidos ou hidróxidos, e por compostos orgânicos como álcool, tiol, ácido carboxílico, entre outros. Porém, a forma mais comum encontrada do anion tungstato é ligada a um cátion, por exemplo sódio, potássio, magnésio e cálcio. O tungstato de sódio dihidratado ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) é um sal branco e inodoro, com textura fina e cristalina que se dissolve facilmente em água. A dose diária indicada de tungstato de sódio estaria entre 0.5 e 50 mg/Kg de peso corporal (GOMIS DE BÁRBARA et al., 2003).

A ação do tungstato de sódio como hipoglicemiante tem sido comprovada em muitos estudos, sendo administrado via oral dissolvido em água destilada numa

concentração de 2 mg/ml e disponibilizado aos animais com livre acesso (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 1997; BARBERA et al., 2001; FERNANDEZ-ALVAREZ et al., 2004; GIRON et al., 2003; MUNOZ et al., 2001). Esses estudos mostraram que o tungstato de sódio estabilizou a glicemia na maioria dos estudos realizados, a concentração da glicose sanguínea nem sempre alcançou níveis iguais aos dos animais saudáveis. Os valores de glicemia apresentados no nosso estudo foram determinados de amostras obtidas no momento do sacrifício do animal. Os animais diabéticos apresentaram valores de glicemia muito elevados comparados aos do controle e os animais diabéticos submetidos ao tratamento com tungstato de sódio apresentaram uma redução da glicemia. Na quinta semana experimental a glicemia do grupo diabético tratado não apresentou diferenças com o grupo controle. Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos presentes na literatura e confirmaram o efeito do tungstato como redutor da glicemia na maioria dos tempos estudados.

O diabetes melito tipo 2 está freqüentemente associado a sobrepeso e obesidade, enquanto que o tipo 1 o indivíduo pode apresentar perda de peso corporal em decorrência do comprometimento de seu metabolismo anabólico, causado pela falta de insulina. Nosso estudo confirmou a perda de peso no modelo experimental de diabetes tipo 1, representado por ratas diabéticos induzidas por estreptozotocina, esse evento foi reproduzido em todas as semanas estudadas. Embora o tungstato de sódio não tenha exercido qualquer efeito sobre o peso corporal dos animais do grupo controle, no grupo diabético tratado este sal potencializou a perda de peso causada pela injeção de estreptozotocina, confirmando dados relatados na literatura (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 1997; BARBERA et al., 2001; GIRON et al.

2003). A perda de peso corporal ocasionada pela administração do tungstato de sódio pode ter sido ocasionada pela diminuição na ingestão alimentar discutida adiante, mas também há outros fatores relevantes. O tungstato de sódio promove o aumento da termogênese e oxidação de lipídeos em tecido adiposo de rato wistar obeso (CLARET et al., 2005). A perda de peso corporal causada pela administração de tungstato de sódio poderia representar um efeito colateral inconveniente ao ser indicado para indivíduos diabéticos do tipo 1, porém seria uma boa alternativa para indivíduos diabéticos do tipo 2 associado à obesidade. Um estudo focalizou o mecanismo molecular pelo qual o tungstato de sódio exerceu controle de massa e melhoria da sensibilidade à insulina em tecido adiposo branco de ratos wistar alimentados com dieta de cafeteria. Esse estudo sugeriu que o tungstato de sódio além de atuar sobre enzimas do metabolismo lipídico, também participa da modulação de proteínas envolvidas na diferenciação de adipócitos, na formação de gotas de lipídeos intracelular, bem como age sobre proteínas estruturais do citoesqueleto do tecido adiposo (BARCELO-BATLLORI et al., 2005).

A indução do diabetes pela estreptozotocina afeta o ganho de peso corporal e potencializa a perda e esse efeito pode ser observado também em tecidos periféricos como as glândulas salivares. Há alguns estudos na literatura que mostraram a perda de peso absoluto da glândula parótida em diferentes períodos experimentais, por exemplo três dias até seis meses após a indução do diabetes (ANDERSON, 1983; ANDERSON et al., 1989; ANDERSON et al., 1993; MAHAY et al., 2004). Em nosso estudo, avaliamos o peso absoluto das glândulas salivares bem como o peso relativo, uma relação com o peso corporal. Nossos resultados estão de acordo com os dados apresentados na literatura, apenas em relação ao peso glandular da submandibular de

ratas diabéticas, que experimentou uma redução absoluta a partir da segunda semana do estudo. A glândula parótida dos animais diabéticos apresentou uma redução do peso apenas na quarta semana experimental, na quinta semana ocorreu uma diferença com o grupo controle devido a um aumento do peso da glândula no grupo diabético. O efeito do tungstato de sódio potencializou a perda de peso de glândula submandibular.

De modo geral, podemos dizer que as diferenças apresentadas no peso relativo de glândula parótida foram ocasionadas por uma redução do peso corporal e não por alterações de peso absoluto da glândula. A submandibular não apresentou diferenças no peso relativo entre os grupos estudados, mostrando que essa glândula acompanha as alterações corpóreas.

O aumento da glicemia provoca um desequilíbrio osmótico, causando um quadro de desidratação intra e extracelular, manifestado clinicamente por poliúria, poligafagia e polidipsia (MANFREDI et al., 2004). Enquanto polidipsia é um sinal clássico causado pelo efeito do diabetes (MAGHNIE, 2003; MAGHNIE et al., 2000), há relatos que mostram efeitos variados sobre a ingestão alimentar. Embora a polifagia tenha sido relatada (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 2001; GIRON et al., 2003), alguns autores não observaram diferenças entre animais saudáveis e diabéticos (ANDERSON, 1983; BARBERA et al., 1997). Nossos resultados mostraram que as ratas diabéticas apresentaram tanto polidipsia quanto polifagia. O tratamento com tungstato de sódio exerceu efeito redutor no consumo de líquidos em todas as semanas estudadas e de alimentos a partir da segunda semana, concordando com os dados presentes na literatura (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 1997; BARBERA et al., 2001; GIRON et al., 2003). Não houve qualquer efeito do tungstato de sódio na ingestão líquida e alimentar no grupo controle

tratado. Além de apresentar um efeito hipoglicemiante e controlador de peso corporal, o tungstato de sódio também possui capacidade de modulador do apetite e da ingestão alimentar. Essas características apontam esse composto como uma alternativa para o tratamento de obesidade ou do diabetes tipo 2 associado a sobrepeso. GOMIS DE BÁRBARA et al. (2003) patentearam o uso de compostos de tungstato como coadjuvante no tratamento de humanos obesos não diabéticos, como terapia anoréxica.

O armazenamento de glicogênio é uma resposta fisiológica ao aumento da concentração de glicose sanguínea que ocorre após as refeições. A glicogênio sintase é uma enzima chave nesse processo pois catalisa a adição de resíduos de glicose a porção terminal não reduzida de uma cadeia de glicogênio inicial, usando como substrato UDP-glicose (FERRER et al., 2003). Embora alguns autores não tenham encontrado diferenças na concentração da proteína glicogênio sintase em hepatócitos isolados de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (LIBAL-WEKSLER et al., 2001), nessa mesma célula de ratos diabéticos Zucker foi observada uma redução da atividade da enzima, com conseqüente diminuição da concentração de glicogênio (SEOANE et al., 1999). Há relatos do aumento da concentração de glicogênio em parótida e submandibular de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, com aumento da atividade da glicogênio sintase e diminuição da glicogênio fosforilase (NICOLAU et al., 2005). Em nossas condições experimentais, os animais diabéticos também apresentaram uma tendência de acúmulo de glicogênio nas glândulas salivares nas semanas iniciais do experimento, tanto em parótida quanto em submandibular.

O tungstato de sódio tem se mostrado como agente ativo no restabelecimento do metabolismo de glicogênio em alguns modelos animais e em diferentes tempos de

administração. Em fígados de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina com dois dias de idade e sacrificados após 2 semanas, os resultados obtidos mostraram aumento do glicogênio quando comparado ao controle, contudo não foi observado qualquer efeito do tungstato no armazenamento desse polissacarídeo e na atividade da glicogênio sintase (BARBERA et al., 1997). O modelo diabético Zucker não apresentou diferenças na concentração de glicogênio de fígado, comparando grupo experimental e controle, entretanto a administração de tungstato de sódio causou um incremento de glicogênio neste tecido (MUNOZ et al., 2001). O diabetes, induzido pela injeção de estreptozotocina em ratos adultos, causou uma redução do glicogênio hepático com restabelecimento de seu metabolismo após 2 semanas e 8 meses de administração de tungstato de sódio (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; BARBERA et al., 2001). Em nossos resultados o efeito do tungstato de sódio como potente estimulador da síntese de glicogênio foi observado apenas na glândula parótida. Não houve qualquer efeito do tungstato de sódio na concentração de glicogênio no grupo controle tratado.

A glicólise é a via central do catabolismo da glicose de forma quase universal, não apenas em animais e vegetais como também na maioria dos microorganismos. A sequência de reações da glicólise difere de uma espécie para outra apenas na forma em que sua velocidade é regulada e no destino metabólico do piruvato formado. Algumas enzimas presentes na via glicolítica desempenham papel chave na sua regulação bem como na sua velocidade catalítica, por exemplo, a hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e piruvato quinase (PK).

Alguns estudos mostram que determinadas alterações metabólicas podem influenciar a atividade de enzimas da via glicolítica de glândulas salivares. Por exemplo,

o excesso de vitamina A diminui a atividade de PFK-1 em glândula submandibular e de PK em parótida e submandibular (SIQUARA-DA-ROCHA et al., 1978). O estado de jejum além de causar redução glicêmica ainda diminuiu a atividade de PFK-1 e PK em submandibular de ratos wistar em diferentes tempos de privação alimentar (LEAL; PEDROSO; NICOLAU, 1979). A hexoquinase de parótida e submandibular também se mostrou suscetível a alteração metabólica causada pelo diabetes induzido por estreptozotocina. Após 30 dias da indução da doença, a submandibular apresentou uma redução de sua atividade na porção solúvel e ligada ao citoesqueleto, enquanto que na parótida o efeito foi contrário (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005). O diabetes provoca a redução na síntese e na atividade enzimática da hexoquinase em musculatura esquelética de ratos (FRANK; FROMM, 1986). Há alguns estudos que relacionam a deficiência do subtipo muscular de PFK-1 com resistência à insulina, deficiência na sua secreção, bem como a instalação precoce do diabetes do tipo 2 em humanos (RISTOW et al., 1997; RISTOW et al., 1999a, 1999b).

Os relatos presentes na literatura mostram que o tungstato de sódio melhora o fluxo glicolítico em diferentes tecidos por exemplo fígado, rins, pâncreas e hepatócitos isolados. Ele estimula a atividade das enzimas da glicólise e aumenta a formação de metabólitos produzidos por essa via, que possuem ação alostérica sob suas enzimas catalíticas (BARBERA; RODRIGUEZ-GIL; GUINOVART, 1994; KIERSZTAN et al., 2004). Além disso, seu efeito se estende para outras vias metabólicas, por exemplo pela inibição da gliconeogênese através do controle da glicose-6-fosfatase (FOSTER et al., 1998).

Nas condições experimentais de nosso estudo a glândula parótida de animais diabéticos apresentou um aumento da atividade enzimática da HK (U/glândula) e da

PFK-1 (U/mg prot) nas semanas iniciais do tratamento, as diferenças apresentadas na atividade da PK não foram muito significativas. Além disso, nossos resultados mostraram que o tungstato de sódio exerceu efeito estimulante da via glicolítica de modo significativo apenas na atividade da PFK-1 de parótida em algumas semanas estudadas. A glândula submandibular apresentou uma estimulação da atividade da HK (U/mg prot) nas semanas iniciais do estudo, mas apenas na terceira semana experimental houve diferença estatisticamente significativa com o grupo controle. Não houve diferenças significantes na atividade de PFK-1 de submandibular entre os grupos estudados no decorrer das semanas estudadas. As diferenças apresentadas na atividade enzimática de PK de submandibular entre grupo controle e experimental foram variáveis ao longo de 6 semanas. Essas diferenças podem ser atribuídas à alterações no grupo controle e não necessariamente ao efeito do diabetes sobre a glândula salivar. O tungstato de sódio não exerceu efeito estimulante da via glicolítica de submandibular, exceto na atividade da HK (U/mg prot) na primeira semana do estudo.

Além da via glicolítica, estudamos outros parâmetros representativos de diferentes vias metabólicas, por exemplo, a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e da lactato desidrogenase (LDH), indicativos de atividade da via das pentoses e do metabolismo anaeróbico, respectivamente. A G6PD é uma enzima que catalisa a via de transformação da glicose-6-fosfato em ribose-5-fosfato e NADPH. A ribose-5-fosfato é utilizada como substrato para síntese de ácidos nucleicos, enquanto que o NADPH é um potente agente redutor com papel essencial na síntese de ácidos graxos, além disso, atua como antioxidante no controle de superóxidos. Em condições anaeróbicas, o NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo O_2 e

sim pelo piruvato, com a formação de lactato. A redução do piruvato é catalisada pela LDH.

Alguns estudos apontam à hiperglicemia como uma causa dos desequilíbrios antioxidantes no organismo de ratos diabéticos (BROWNLEE, 2001; ROLO; PALMEIRA, 2006). Há relatos que mostram nenhuma correlação entre a formação de NADPH pela atividade da enzima G6PD e o diabetes em fígado de ratos induzidos pela injeção de estreptozotocina (ULUSU et al., 2005) e outros que apontam um aumento da atividade da enzima em cérebro de ratos diabéticos (ULUSU et al., 2003). A LDH é uma enzima que pode ser relacionada com dano celular, porém em animais diabéticos submetidos a um processo de reparação tecidual foi mostrado uma redução da atividade da LDH e um aumento da G6PD (GUPTA; RAGHUBIR, 2005). Não há relatos do efeito do tratamento com tungstato de sódio sobre a atividade enzimática da G6PD e da LDH em tecidos de ratos diabéticos. Nossos estudos mostraram uma estimulação da G6PD de parótida de animais diabéticos nas semanas iniciais do tratamento (U/mg prot) e nenhuma diferença na glândula submandibular. Na segunda semana do estudo, o tungstato de sódio causou um aumento da atividade da enzima em parótida (U/mg prot e U/glândula) e em submandibular (U/mg prot) de ratos diabéticos tratados. Nossos resultados mostraram uma redução da atividade da LDH em animais diabéticos na primeira semana do estudo em parótida e submandibular (U/mg prot e U/glândula). Não houve diferenças significativas do tungstato de sódio sob a atividade da LDH nas glândulas salivares de animais diabéticos tratados nas semanas estudadas.

Além do estudo do efeito do tungstato de sódio sobre a glicemia, peso corporal e glandular, ingestão líquida e alimentar e metabolismo energético de glândulas salivares, também avaliamos sua influência na composição orgânica de parótida, submandibular e

saliva total estimulada com pilocarpina e isoproterenol. Os parâmetros avaliados nos quatro grupos estudados foram a concentração de proteína total, atividade enzimática de amilase e peroxidase e teor de ácido siálico livre e total. De modo geral, podemos observar que a glândula parótida foi mais susceptível ao efeito do diabetes, com uma estimulação dos parâmetros estudados nas semanas iniciais e uma tendência de regularização no final dos experimentos. O tungstato de sódio não apresentou um efeito marcante e característico sobre os parâmetros estudados, com exceção de um controle da atividade da peroxidase.

Em nossas condições experimentais, as diferenças na concentração de proteína total entre controle e diabéticos foram restritas a uma diminuição de parótida na segunda semana, enquanto que a glândula submandibular apresentou um aumento na quinta semana no grupo diabético. O tungstato de sódio não exerceu efeitos significativos sobre a concentração de proteínas de glândulas salivares.

A atividade enzimática de amilase e peroxidase tem sido foco de investigação como indicativo de função de glândula parótida e submandibular. Um estudo (Anderson, 1983) avaliou a atividade dessas enzimas em parótida de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina ao longo de 30 dias e o resultado foi uma redução brusca da atividade da amilase nos primeiros dias de experimento, com uma estabilização no período restante. A peroxidase de parótida de animais diabéticos sofreu um aumento lento e gradual em sua atividade ao longo de todo experimento (ANDERSON, 1983). Outro estudo mostrou uma redução da amilase de células isoladas de parótida de ratos diabéticos após a estimulação com noradrenalina, porém não houve diferenças na atividade basal da enzima (MAHAY et al., 2004). Embora alguns estudos observaram uma redução da atividade da amilase, há relatos que mostraram que não há diferenças

na síntese da proteína, mas sim na sua atividade catalítica (ANDERSON; BEVAN, 1992).

Embora esses estudos tenham apontado uma redução da atividade da amilase em glândulas salivares de ratos diabéticos, nossos resultados efeitos variáveis da amilase ao longo das semanas estudadas. A glândula parótida do grupo diabético apresentou uma estimulação da enzima na segunda semana do estudo, uma redução na quinta, alcançando níveis próximos do controle nas semanas restantes. Não foram observados efeitos significativos do tungstato de sódio sobre a atividade da amilase de parótida, com exceção de uma redução na primeira e terceira semana do estudo nos grupos controle e diabético tratado. A glândula submandibular não apresentou diferenças entre os grupo controle e diabéticos. O efeito do tungstato de sódio nessa glândula foi variável, com uma inibição da atividade da enzima do grupo controle e diabético tratado na primeira semana e uma estimulação do grupo diabético tratado nas últimas semanas estudadas. Nossos resultados apontam uma tendência de aumento da atividade da peroxidase em parótida e submandibular no grupo diabético e o tratamento com tungstato de sódio tende a manter a atividade dessa enzima num nível próximo do controle, sugerindo que este sal poderia exercer efeito sob o sistema antioxidante de glândulas salivares.

Os resultados da concentração de ácido siálico em glândulas salivares de ratos diabéticos são contraditórios. Existem relatos que mostram aumento (NICOLAU; ROSA; FAVA-DE-MORAES, 1969), diminuição (MICKELBOROUGH, 1967) ou nenhuma diferença significativa na concentração de ácido siálico (ZEBROWSKI; BRIMMER, 1978) na glândula submandibular. Nossos resultados mostraram um aumento na concentração de ácido siálico livre e total em glândula parótida de ratos diabéticos no

início do estudo e nenhuma diferença na glândula submandibular. Não foram observados efeitos significativos do tungstato de sódio sobre a concentração de ácido siálico livre e total nas glândulas estudadas.

Os resultados do nosso estudo mostraram um aumento na concentração de proteína total em saliva estimulada por pilocarpina e isoproterenol de ratos diabéticos. Nossos resultados estão de acordo com alguns estudos em saliva de pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2 (DODDS; YEH; JOHNSON, 2000; LOPEZ et al., 2003; MATA et al., 2004), embora há relatos que apontem nenhuma diferença significativa (MEURMAN et al., 1998). Foi observado que o tungstato promove o aumento de proteínas em saliva de ratos controle e diabético tratados.

Embora o estado diabético tenha causado um aumento na concentração de proteínas em saliva, essa diferença não foi observada na atividade da amilase e peroxidase, com exceção na primeira semana do estudo da enzima antioxidante. Alguns estudos mostram um aumento na atividade da amilase de pacientes diabéticos do tipo 1 e tipo 2 (DODDS; DODDS, 1997; LOPEZ et al., 2003), enquanto outros mostram nenhuma diferença significativa (MEURMAN et al., 1998). Outro estudo com hamsters diabéticos mostrou uma redução da atividade da peroxidase na saliva desses animais comparada com o grupo controle (MURATSU; MORIOKA, 1985). Apesar de não serem observadas diferenças na atividade da amilase e peroxidase entre animais controle e diabéticos, o tratamento com tungstato de sódio causou uma redução significativa na atividade das enzimas nos grupos tratados em todas as semanas estudadas para a amilase e na segunda semana para a peroxidase. Assim, nossos resultados mostraram que o tungstato de sódio potencializa o aumento quantitativo de

proteínas na saliva, porém não há aumento qualitativo, representado pela diminuição da atividade das enzimas estudadas.

A proteína quinase C (PKC) é uma enzima presente na via de secreção de saliva e esta envolvida com a síntese de proteínas e eletrólitos em glândulas salivares após uma estimulação parassimpática. Um estudo em linhas de células estabelecidas de glândula submandibular mostrou que o uso de inibidores específicos de PKC diminuiu a síntese de amilase, sugerindo o envolvimento dessa quinase na produção da enzima (JUNG et al., 2000). Há relatos do aumento na expressão de PKC em glândulas salivares de camundongo diabéticos não obesos (NOD Mouse) num curto período de tempo (TENSING et al., 2005). Em nosso estudo, sacrificamos os quatro grupos experimentais após uma semana do início do tratamento e avaliamos por western blot a expressão de isoformas de PKC clássica (ativa – isoformas desfosforiladas) e total (inativa – isoformas fosforiladas) nas glândulas parótida e submandibular. Nossos resultados confirmam os estudos presentes na literatura, pelo aumento na expressão de isoformas clássica e total PKC em submandibular de ratos diabéticos. Os ratos diabéticos não apenas apresentaram uma maior expressão de PKC, como também ocorreu uma diferença qualitativa no padrão de isoformas de PKC nesses animais. Não houve diferenças significantes em parótida dos grupos estudados. Embora não tenha sido determinada a atividade de PKC, esse aumento na expressão da enzima poderia significar uma estimulação dessa via de síntese de proteínas. Esse poderia ser um argumento para justificar o aumento na concentração de proteínas encontrado em saliva de ratos diabéticos. Há relatos que mostraram que a ativação de PKC em células acinares de glândulas salivares promoveu uma indução do processo apoptótico com aumento da fragmentação de DNA (REYLAND et al., 2000). Assim, podemos sugerir

que a indução da expressão de PKC em glândulas salivares de ratos diabéticos poderia causar uma degradação de glândulas salivares. O estudo da PKC mostra que há uma alteração na via de sinalização parassimpática de glândula parótida, indicando uma possível neuropatia em glândulas salivares. Além disso, foi observado que o tungstato de sódio potencializa a indução de PKC em submandibular do grupo diabético tratado, o que poderia contribuir para acelerar este processo degenerativo.

7 CONCLUSÕES

- O presente estudo confirma o potencial do tungstato como agente hipoglicemiante, regulador da polidipsia, modulador do apetite, bem como seu efeito sobre o controle o ganho de peso corporal. Essas características desse composto poderia ser convenientes para o tratamento do diabetes do tipo 2 associado à obesidade, porém poderia apresentar efeitos colaterais inadequados ao tratamento do diabetes do tipo 1.
- O diabetes apresentou efeito distinto no peso absoluto de glândulas salivares. A submandibular sofreu uma perda absoluta de seu peso e o tratamento com tungstato de sódio potencializou essa perda.
- Em nossas condições experimentais, o metabolismo energético da glândula parótida apresentou uma maior susceptibilidade ao diabetes. De modo geral, os parâmetros metabólicos que se apresentaram alterados sofreram uma estimulação nas semanas iniciais do tratamento, porém com uma normalização nas semanas finais do estudo. Esse fato poderia sugerir que as glândulas salivares possuem algum mecanismo de defesa compensatório contra a injeção intraperitoneal de estreptozotocina.

- Os efeitos do tungstato de sódio sobre o metabolismo energético de glândulas salivares foram pouco significativos. Esses resultados nos levam a fazer duas inferências relacionadas com o tungstato de sódio: primeira – nossos resultados não confirmam o potencial desse composto como restabelecedor do metabolismo energético; segunda - o tungstato de sódio tem ação anabólica estimulante em fígado e musculatura esquelética, porém não há alterações em tecidos periféricos como as glândulas salivares, o que seria um bom indicativo de baixa toxicidade desse sal.
- Não apenas os parâmetros do metabolismo energético sofreram estimulação nas semanas iniciais com normalização nas semanas finais do experimento. Podemos observar que a composição bioquímica das glândulas salivares também sofre o mesmo efeito, especialmente a parótida.
- Em relação ao efeito do tratamento do tungstato sobre a composição protéica de glândulas salivares, podemos dizer que o principal parâmetro influenciado pela sua administração foi a atividade da peroxidase. Esse resultado sugere que mais estudos devem ser realizados correlacionando o tungstato de sódio com o sistema antioxidante em diferentes tecidos, especialmente glândulas salivares de animais diabéticos.
- Os animais diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentam um aumento na concentração de proteína em saliva total estimulada por pilocarpina e

isoproterenol. Não houve diferenças significativas na atividade da amilase e peroxidase comparando saliva de ratos controle e diabéticos nas semanas estudadas.

- O estudo da expressão de PKC em glândulas salivares mostrou uma estimulação dessa enzima causada pelo estado diabético em glândula submandibular. Esse resultado mostra que em apenas uma semana após a indução do diabetes se encontram alterações em parâmetros da via de sinalização protéica de glândulas salivares. O aumento da expressão de PKC sugere uma possível neuropatia em submandibular de ratos diabéticos.
- A administração de tungstato de sódio potencializa a expressão de isoformas ativas e inativas de PCK em glândula submandibular.

REFERÊNCIAS¹

Aminoff D. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem J* 1961;81:84-92.

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

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

Anderson LC, Bevan CA. Effects of streptozotocin diabetes on amylase release and cAMP accumulation in rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* 1992;37(5):331-6.

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, 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, 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.

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.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

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.

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.

Barcelo-Batllori S, Corominola H, Claret M, Canals I, Guinovart J, Gomis R. Target identification of the novel antiobesity agent tungstate in adipose tissue from obese rats. *Proteomics* 2005;5(18):4927-35.

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

Becker DJ, Reul B, Ozcelikay AT, Buchet JP, Henquin JC, Brichard SM. Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia* 1996;39(1):3-11.

Berg EA, Wu JY, Campbell L, Kagey M, Stapleton SR. Insulin-like effects of vanadate and selenate on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and fatty acid synthase in diabetic rats. *Biochimie* 1995;77(12):919-24.

Bouché C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine A. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 2004;25(5):807-830.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813-20.

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

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

Chen-Zion M, Livnat T, Beitner R. Effects of long-term streptozotocin diabetes on cytoskeletal and cytosolic phosphofructokinase and the levels of glucose 1,6-

bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate in different rat muscles. *Biochem Med Metab Biol* 1994;53(2):137-44.

Claret M, Corominola H, Canals I, Saura J, Barcelo-Batlloiri S, Guinovart JJ, et al. Tungstate decreases weight gain and adiposity in obese rats through increased thermogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology* 2005;146(10):4362-9.

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

Dawes C. How much saliva is enough for avoidance of xerostomia? *Caries Res* 2004;38(3):236-40.

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.

Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28(5):373-81.

Domingo JL. Vanadium and tungsten derivatives as antidiabetic agents: a review of their toxic effects. *Biol Trace Elem Res* 2002;88(2):97-112.

Fernandez-Alvarez J, Barbera A, Nadal B, Barcelo-Batlloiri S, Piquer S, Claret M, et al. Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate. *Diabetologia* 2004;47(3):470-7.

Ferreira FD, Nicolau J. Changes in glucose metabolism in submandibular salivary glands of rats after isoproterenol or incisor-tooth amputation. *Arch Oral Biol* 1987;32(7):499-503.

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.

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

Foster JD, Young SE, Brandt TD, Nordlie RC. Tungstate: a potent inhibitor of multifunctional glucose-6-phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 1998;354(1):125-32.

Frank SK, Fromm HJ. Effect of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the degradation of hexokinase II in the skeletal muscle of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;138(1):374-80.

Garret JR, Ekström J, Anderson LC. Hormonal regulation of salivary glands, with particular reference to experimental diabetes. In: *Glandular mechanisms of salivary secretion - Frontiers of oral biology*. Lindor: Karger; 1998. Chapter 12, p.200-221.

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.

Gomis de Bárbara R, Claret Carles M, Guinovart J, Fernandez Alvares J (2003). In: *Composiciones orales para el tratamiento de humanos obesos y no diabéticos*. Oficina Española de Patentes y Marcas. España, ES 2 187 276 A1.

Goto Y, Kida K, Ikeuchi M, Kaino Y, Matsuda H. Synergism in insulin-like effects of molybdate plus H₂O₂ or tungstate plus H₂O₂ on glucose transport by isolated rat adipocytes. *Biochem Pharmacol* 1992;44(1):174-7.

Gupta A, Raghubir R. Energy metabolism in the granulation tissue of diabetic rats during cutaneous wound healing. *Mol Cell Biochem* 2005;270(1-2):71-7.

Guyton A, Hall JE. *Tratado de fisiología médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Herp A, Wu AM, Moschera J. Current concepts of the structure and nature of mammalian salivary mucous glycoproteins. *Mol Cell Biochem* 1979;23(1):27-44.

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.

Ihalin R, Loimaranta V, Tenovu J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys* 2006;445(2):261-8.

Jung DW, Hecht D, Ho SW, O'Connell BC, Kleinman HK, Hoffman MP. PKC and ERK1/2 regulate amylase promoter activity during differentiation of a salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 2000;185(2):215-25.

Kandra L, Zajacz A, Remenyik J, Gyemant G. Kinetic investigation of a new inhibitor for human salivary alpha-amylase. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;334(3):824-8.

Kiersztan A, Winiarska K, Drozak J, Przedlacka M, Wegrzynowicz M, Fraczyk T, et al. Differential effects of vanadium, tungsten and molybdenum on inhibition of glucose formation in renal tubules and hepatocytes of control and diabetic rabbits: beneficial action of melatonin and N-acetylcysteine. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):9-21.

Leal A, Pedroso FI, Nicolau J. The effect of food deprivation on the activities of some enzymes of metabolism of carbohydrates in the submandibular salivary glands of rats. *International Journal Vitamin Nutritional Research* 1979;50(92-95).

Leggett RW. A model of the distribution and retention of tungsten in the human body. *Sci Total Environ* 1997;206(2-3):147-65.

Li J, Elberg G, Gefel D, Shechter Y. Permolymolybdate and pertungstate--potent stimulators of insulin effects in rat adipocytes: mechanism of action. *Biochemistry* 1995;34(18):6218-25.

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.

Lin CC, Sun SS, Kao A, Lee CC. Impaired salivary function in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus with xerostomia. *J Diabetes Complications* 2002;16(2):176-9.

Lopez ME, Colloca ME, Paez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. *Braz Dent J* 2003;14(1):26-31.

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

Maghnie M. Diabetes insipidus. *Horm Res* 2003;59 Suppl 1:42-54.

Maghnie M, Cosi G, Genovese E, Manca-Bitti ML, Cohen A, Zecca S, et al. Central diabetes insipidus in children and young adults. *N Engl J Med* 2000;343(14):998-1007.

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.

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.

Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem* 2004;261(1-2):137-42.

Matsumoto J. Vanadate, molybdate and tungstate for orthomolecular medicine. *Med Hypotheses* 1994;43(3):177-82.

McNeill JH, Delgatty HL, Battell ML. Insulinlike effects of sodium selenate in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1991;40(12):1675-8.

Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, Toyry J, Alakuijala P, Keinanen S, et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects: The role of the autonomic nervous system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86(1):69-76.

Mickelborough ME. The metabolism of certain carbohydrate constituents of rat submaxillary gland. *J Dent Res* 1967;46(1):82-6.

Munoz MC, Barbera A, Dominguez J, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ. Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes* 2001;50(1):131-8.

Muratsu K, Morioka T. Levels of salivary lysozyme, lactoperoxidase, and lactoferrin in diabetic hamsters. *Infect Immun* 1985;48(2):389-94.

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, Rosa R, Fava-de-Moraes F. The effect of alloxan diabetes upon N-acetylneuraminic acid concentration in the submaxillary glands of rats. *Acta Physiol Lat Am* 1969;19(2):106-10.

Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2005;353(1-2):133-9.

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.

Reuterving CO, Hagg E, Henriksson R, Holm J. Salivary glands in long-term alloxan-diabetic rats. A quantitative light and electron-microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1987;95(3):131-6.

Reyland ME, Barzen KA, Anderson SM, Quissell DO, Matassa AA. Activation of PKC is sufficient to induce an apoptotic program in salivary gland acinar cells. *Cell Death Differ* 2000;7(12):1200-9.

Ristow M, Carlqvist H, Hebinck J, Vorgerd M, Krone W, Pfeiffer A, et al. Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans is associated with impairment of insulin secretory oscillations. *Diabetes* 1999;48(8):1557-61.

Ristow M, Vorgerd M, Mohlig M, Schatz H, Pfeiffer A. Deficiency of phosphofructo-1-kinase/muscle subtype in humans impairs insulin secretion and causes insulin resistance. *J Clin Invest* 1997;100(11):2833-41.

Ristow M, Vorgerd M, Mohlig M, Schatz H, Pfeiffer A. Insulin resistance and impaired insulin secretion due to phosphofructo-1-kinase-deficiency in humans. *J Mol Med* 1999;77(1):96-103.

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

Scacchi GE, Turyn D, Dellacha JM. Identification of insulin binding sites in isolated cells from rat submaxillary gland. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* 1988;21(1):189-93.

Seoane J, Barbera A, Telemaque-Potts S, Newgard CB, Guinovart JJ. Glucokinase overexpression restores glucose utilization and storage in cultured hepatocytes from male Zucker diabetic fatty rats. *J Biol Chem* 1999;274(45):31833-8.

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.

Siquara-da-Rocha MC, Sarkis JJ, Padial E, Silva CL, Nicolau J. Enzymes of the carbohydrate metabolism in salivary glands from rats submitted to excess of vitamin A. *Int J Vitam Nutr Res* 1978;48(3):225-8.

Skoza L, Mohos S. Stable thiobarbituric acid chromophore with dimethyl sulfoxide. Application to sialic acid assay in analytical de-O-acetylation. *Biochem J* 1976;159(3):457-62.

TenCate AR. Glândulas salivares. In: *Histologia Bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

Tenovuo J, Pruitt KM. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol* 1984;13(6):573-84.

Tensing EK, Ma J, Hukkanen M, Fox HS, Li TF, Tornwall J, et al. Protein kinase C expression in salivary gland acinar epithelial cells in non-obese diabetic mice, an experimental model for Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int* 2005;25(1):28-32.

Thylstrup AFO. *Textbook of clinical cariology*. Copenhagen: Munksgaard; 1994.

Ulusu NN, Ozbey G, Tandogan B, Gunes A, Durakoglugil DB, Karasu C, et al. Circadian variations in the activities of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-

phosphate dehydrogenase in the liver of control and streptozotocin-induced diabetic rats. *Chronobiol Int* 2005;22(4):667-77.

Ulusu NN, Sahilli M, Avci A, Canbolat O, Ozansoy G, Ari N, et al. Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E. *Neurochem Res* 2003;28(6):815-23.

Vacca Smith AM, Bowen WH. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 2000;45(4):277-91.

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.

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.

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

Zebrowski EJ, Brimmer M. Effect of alloxan-diabetes on alpha-amylase and sialic acid levels in the parotid and submandibular glands of rats. *Pharmacol Ther Dent* 1978;3(1):7-16.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo PROTOCOLO nº 03/04
PARECER nº 03/04

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa “*Glândulas salivares, saliva e Diabetes, estudo de alguns parâmetros em ratos diabéticos induzidos por Estreptozotocina*”, sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. 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, 10 de fevereiro de 2004

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOUSP