

JONAS ALENCAR DE MATOS

**ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO DURANTE O
DIA EM GLÂNDULAS SUBMANDIBULARES
E PARÓTIDAS DE RATOS**

São Paulo

2009

Jonas Alencar de Matos

**Alteração da concentração de glicogênio durante o dia em
glândulas submandibulares e parótidas de ratos**

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

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

São Paulo

2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matos JA. Alteração da concentração de glicogênio durante o dia em glândulas submandibulares e parótidas de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, ___/___/2009

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: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa Helena pelo apoio, carinho, companheirismo e amor que nunca me faltou.

Aos meus pais, João e Ana que sempre me cuidaram com muito amor e carinho, me criaram e sempre me motivaram em minha vida profissional. Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

Ao meus irmãos, Caio e Vitor, e toda minha família que sempre me acompanharam durante bons e não tão bons momentos de minha vida.

Ao meu professor, orientador e amigo Fernando Neves Nogueira por me orientar durante a pós graduação e pelos bons anos de convivência no laboratório de Biologia Oral.

Agradeço muito a essa grande pessoa que é o professor José Nicolau que me acolheu em seu laboratório e com paciência e sabedoria me instruiu antes e durante esse trabalho. A grandeza do senhor começa pelo time de futebol do coração, de um grande corinthiano só poderíamos esperar coisas boas. O senhor é um exemplo a ser seguido e sempre será nosso grande mestre.

Ao amigo Douglas por toda dedicação ao laboratório, pelos ensinamentos laboratoriais e outros mais. Pela companhia e amizade que renderam boas risadas e ótimos momentos juntos.

A todos meus colegas e amigos de laboratório Walter, Fausto, Mariana, Emily, Alyne, Flávia, Paula, Marcela, Ana Paula e Luana por fazerem desse laboratório um lugar bom e agradável para se trabalhar.

Aos meus colegas de pós graduação por terem compartilhado os momentos bons e difíceis da pós graduação.

Ao André, Maico e Andreia pela companhia, amizade e paciência pois me aguentaram 6 anos durante a faculdade, me toleraram por mais algum tempo durante a pós graduação.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Materiais Dentários, aos técnicos e funcionários por toda a ajuda e paciência. Obrigado a Professora Rosa Helena Miranda Grande por toda dedicação a pós graduação e a Rosinha por toda ajuda durante todo meu mestrado, não só a mim como para todos os pós graduandos.

A todos que posso ter esquecido e que de maneira direta ou indireta fizeram parte desse trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo apoio financeiro a pesquisa realizada no laboratório de Biologia Oral inclusive no projeto que essa dissertação fez parte.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio a esta dissertação com a bolsa de estudos.

Matos JA. Alteração da concentração de glicogênio durante o dia em glândulas submandibulares e parótidas de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

As glândulas salivares são glândulas exócrinas que vertem seus produtos para cavidade oral. As principais glândulas são as parótidas, sublinguais e submandibulares sendo elas as responsáveis pela contribuição do maior volume de saliva durante o processo de secreção que, assim como todas as atividades que nosso corpo exerce, também dependem de energia. A secreção salivar consome glicose e mobiliza o glicogênio para adquirir energia, e este processo pode sofrer influencia de alguns fatores dentre eles o estado diabético e o ritmo circadiano. O diabetes altera todo o metabolismo de carboidratos e diminui o fluxo salivar. Já o ritmo circadiano promove uma alteração fisiológica no fluxo e composição da saliva de acordo com o horário do dia. Desta forma o objetivo deste trabalho foi em um primeiro momento observar o comportamento da concentração de glicogênio em glândulas parótidas e submandibulares de ratos com diferentes idades e condições alimentares em um determinado período do dia. Em um segundo momento observar as alterações que ocorrem na concentração de glicogênio em ratos diabéticos durante o dia. Na primeira fase do estudo foram utilizados ratos saudáveis com 21, 30 e 60 dias de vida, divididos em grupos alimentado e alimentados com restrição. No grupo com restrição de alimento os animais ficaram restritos a alimentação noturna (19 – 7 horas) desde 2 dias antes do sacrifício. Na segunda fase do estudo,

com ratos diabéticos, foram utilizados animais com 60 dias de vida e a indução do diabetes foi realizada através de uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (65 mg/Kg p.c.). 30 dias após a indução os animais foram sacrificados. Em todos os grupos o sacrifício foi realizado nos seguintes horários - 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 horas. As glândulas submandibulares e parótidas foram removidas imediatamente para posterior análise da concentração de glicogênio. Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes ANOVA e o teste de Tukey ($p < 0.05$). Os resultados obtidos com os animais normais mostra uma variação da concentração de glicogênio durante o período analisado nas duas glândulas, sendo mais evidente quando os ratos não foram submetidos a restrição de alimento. Nesta condição a variação da concentração de glicogênio em glândulas parótidas pouco alterou independente da idade. Nos animais diabéticos observamos um acúmulo de glicogênio nas glândulas parótidas e uma diminuição da concentração de glicogênio em submandibulares. Durante o período analisado também houve pouca variação da concentração de glicogênio, assim como nos animais não diabéticos, sendo evidente a menor interferência do ritmo circadiano no estado diabético. Esse estudo nos mostrou que o ritmo circadiano interfere na concentração de glicogênio das glândulas salivares parótidas e submandibulares de ratos durante o período analisado e que a restrição de alimento durante o dia alterou a concentração de glicogênio principalmente nas glândulas parótidas. Observamos também que no estado diabético ocorre um acúmulo do glicogênio em glândulas parótidas e uma diminuição nas glândulas submandibulares.

Palavras-Chave: Glândulas salivares, glicogênio, *diabetes mellitus*, ritmo circadiano

Matos JA. Variation of glycogen concentration in parotid and submandibular gland of rats during the day [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

The secretory process is very important for oral health. The majors salivary glands (parotid, submandibular and sublingual) are the most important for secretion of saliva, for this activity the glands needs energy and a common way obtain is using glucose from the mobilization of glycogen during the fast period. Because of the importance of glycogen in this process, this study aimed to analyze the behavior of glycogen concentration during the day (7 to 19 hours) in parotid, and submandibular glands of rats. In the first moment the study was made with health male rats in different ages (21, 30 and 60 days old), divided in a group with free access to food and other group fed only during the night (19 to 7 hours). The second part of the study was made using diabetic male rats to search for alterations caused by this disease in glycogen concentration. All animals were killed during the day in different hours (7, 9, 11, 13, 15, 17,19 hours), their glands were removed and clamped between aluminium plates pre-cooled in dry ice. The frozen glands were then stored at -80°C until analysis of glycogen concentration. The statistical analyses was made using ANOVA test and Tukey ($p < 0,5$). In the group of health rats we observed a variation of the glycogen concentration during the period analyzed in both glands, but it became more evident when the animals had free access to food. When they were fed during the night the variation of the glycogen concentration in parotid

glands were not so evident. The results with diabetics rats showed a higher accumulation of glycogen in parotid glands and a lower concentration of glycogen in submandibular glands. In this period we could not see the variation of glycogen that happen in health rats. This study showed that circadian rhythm modify the concentration of glycogen in parotid and submandibular glands in health rats and the restriction of food made alterations in glycogen concentration of parotid glands. In diabetic rats was possible to see a higher concentration of glycogen in parotid and lower concentration in submandibular gland compared with health rats.

Keywords: Salivary glands, glycogen, diabetes mellitus, circadian rhythm

SUMÁRIO

| | p. |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 Glândulas salivares e secreção salivar | 16 |
| 2.2 Metabolismo de glicogênio e as glândulas salivares | 18 |
| 2.2.1 metabolismo de glicogênio | 18 |
| 2.2.2 o glicogênio nas glândulas salivares | 22 |
| 2.3 Diabetes mellitus e sua influência na cavidade oral | 24 |
| 2.3.1 diabetes mellitus | 24 |
| 2.3.2 interferência do diabetes nas glândulas salivares | 25 |
| 2.3.3 diabetes e o glicogênio | 28 |
| 2.4 Ritmo circadiano e a secreção salivar | 29 |
| 2.4.1 ritmo circadiano | 29 |
| 2.4.2 ritmo circadiano no processo de secreção salivar | 31 |
| 3 PROPOSIÇÃO | 32 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Animais | 33 |
| 4.1.2 indução do diabetes | 34 |
| 4.2 Obtenção das amostras | 34 |
| 4.3 Determinações | 35 |
| 4.3.1 determinação da glicemia | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3.2 determinação do glicogênio glandular..... | 35 |
| 4.4 Análise estatística..... | 36 |
| 5 RESULTADOS | 37 |
| 5.1 Resultados em ratos normais com diferentes idades..... | 37 |
| 5.2 Resultados em ratos diabéticos..... | 40 |
| 6 DISCUSSÃO | 54 |
| 6.1 Experimentos em ratos normais com diferentes idades..... | 54 |
| 6.2 Experimento em ratos diabéticos..... | 60 |
| 7 CONCLUSÕES | 63 |
| REFERÊNCIAS | 64 |

1 INTRODUÇÃO

As glândulas salivares são glândulas exócrinas que vertem seus produtos para cavidade oral formando na cavidade oral a saliva total. Elas estão distribuídas na cavidade oral e podem ser classificadas em glândulas salivares maiores e glândulas salivares menores. As glândulas salivares maiores se apresentam em três pares, as parótidas, sublinguais e submandibulares, e são elas as responsáveis pelo maior volume de saliva secretado para cavidade oral.

Para toda atividade que nosso corpo exerce ocorre a demanda por energia, cuja fonte principal é a glicose. Em nosso organismo ela é convertida em adenosina trifosfato (ATP), sendo utilizada pelas células de nosso corpo durante suas atividades. Para os períodos de jejum nosso organismo armazena glicose na forma de glicogênio, que nada mais é do que um polímero de glicose que é quebrado quando ocorre à demanda por energia disponibilizando certa quantidade dessa molécula. O glicogênio pode ser usado tanto para manutenção dos níveis glicêmicos como faz o fígado, ou como fonte própria de energia de um órgão como fazem os músculos. As glândulas salivares não funcionam de maneira diferente, elas necessitam de energia para o processo de secreção e também mobilizam glicogênio durante esse processo (NICOLAU; SASSAKI, 1983; SCHRAMM; BEN-ZVI; BDOLAH, 1965), porém o metabolismo de carboidratos entre as glândulas possuem suas particularidades (NICOLAU; SASSAKI, 1976).

O processo de secreção das glândulas salivares pode ser alterado por diversos fatores. Entre eles podemos citar o estado diabético e o ritmo circadiano. O

ritmo circadiano, entre as suas várias interferências em nosso organismo ele altera o fluxo salivar e a composição da saliva ao longo das 24 horas do dia, ocorrendo um aumento durante o dia e caindo durante a noite, chegando a níveis próximos de zero neste período (DAWES, 1972; DAWES, 1974; DAWES, 1975; MILLS, 1966).

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica resultante de uma deficiência na secreção de insulina ou uma redução da efetividade biológica dela, ou ambos, que provoca um aumento da glicemia dando origem a algumas complicações sistêmicas no organismo (KUZUYA et al., 2002). Os dois tipos mais comuns são o Tipo I e Tipo II. O diabetes Tipo I acomete principalmente crianças e jovens, o Tipo II já acomete mais pessoas adultas e principalmente com sobre peso. O diabetes tipo I é causado por uma reação auto-imune e destruição nas células β das ilhotas de Lagerhans do pâncreas. O tipo II é causado por uma deficiência de sensibilidade dos receptores de insulina ou deficiência na produção de insulina, os dois tipos de diabetes estão associados a fatores genéticos e ambientais como fatores etiológicos.

Entre as manifestações bucais associadas ao diabetes está a hipossalivação, xerostomia, gengivite, periodontite, abscessos dentais e freqüentemente lesões na mucosa e língua (DARNELL; SAUNDERS, 1990). As manifestações crônicas do diabetes são retinopatias, insuficiência renal crônica, disfunção autonômica sensitiva, motora e outras neuropatias, dificuldade de oxigenação dos tecidos que podem levar a gangrenas, arteriosclerose, microanginas e macroangiopatias (BROWNLEE; CERAMI, 1981). A xerostomia é a manifestação bucal freqüentemente relatada por pacientes diabéticos, por esse motivo muitos trabalhos tem a finalidade de estudar a influência do diabetes em glândulas salivares.

Em estudos com ratos diabéticos já foi descrito uma alteração no metabolismo de glicogênio das glândulas salivares desses animais (NICOLAU et al., 2005). Devido à íntima relação da degradação de glicogênio como fonte de energia para a secreção salivar, a alteração da concentração desse polímero em glândulas de ratos diabéticos e a interferência do ritmo circadiano nesse processo, tivemos como objetivo verificar a alteração da concentração de glicogênio em glândulas salivares parótidas e submandibulares de ratos com livre acesso ao alimento, ratos com alimentação noturna e ratos diabéticos, durante o período do dia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glândulas salivares e secreção salivar

As glândulas salivares são glândulas exócrinas que vertem seus produtos para cavidade oral formando, junto aos restos alimentares e células epiteliais descamadas, a saliva total. As glândulas salivares podem ser classificadas como maiores e glândulas salivares menores. As glândulas salivares menores estão distribuídas em quase toda a cavidade oral, só não estão presentes na porção anterior do palato duro e na gengiva inserida. As glândulas salivares maiores se apresentam aos pares, distribuídas simetricamente na face, são elas as glândulas sublinguais, parótidas e submandibulares. As glândulas salivares maiores são responsáveis pela produção e secreção de 90% da saliva da cavidade oral e cada uma delas contribuem com volumes diferentes dependendo do tipo de estímulo. A saliva não estimulada é derivada principalmente das glândulas submandibulares (SM) e sublingual (SL), já a saliva estimulada tem uma grande contribuição das glândulas parótidas (PA) (PEDERSEN et al., 2002).

A redução do fluxo salivar pode ser decorrente de diversos fatores entre eles estão algumas patologias como o diabetes e a ingestão de medicamentos (SREEBNY; VALDINI; YU, 1989; SREEBNY et al., 1992; SREEBNY; SCHWARTZ, 1997). Essa diminuição da quantidade de saliva provocada pela deficiência do

processo de secreção das glândulas salivares pode implicar em um prejuízo à cavidade oral já que é ela a maior responsável pela proteção desse meio. A sua ausência causa grandes danos aos tecidos duros e moles presentes na boca (AMERONGEN; VEERMAN, 2002) pois é ela quem lubrifica os tecidos bucais, participa do processo de remineralização do dente, protege contra microorganismos, além de participar no processo digestório e ser essencial para que tenhamos o paladar inalterado. O paladar que também colabora com a secreção salivar pois é um estímulo para a sua secreção (SPEIRS, 1971).

A saliva secretada por cada uma das glândulas possui características distintas dependendo da unidade secretora predominante em seus ácinos: serosa ou mucosa. As SL são glândulas com unidades secretoras predominantemente mucosas porém possuem semiluas serosas, portanto a saliva produzida por elas é caracterizada por uma secreção com pouco conteúdo enzimático, mas com bastante quantidade de glicoproteínas com grandes cadeias de carboidratos, caracterizando o muco. As SM são glândulas mistas que possuem os dois tipos de unidades secretoras, porém as unidades serosas são predominante em relação as mucosas. As PA são glândulas com unidades secretoras serosas caracterizando uma secreção rica em proteínas e mais fluida (KATCHBURIAN; ARANÃ-CHAVES, 1999). A saliva primaria quando secretada pelos ácinos passa por uma sequência de ductos até chegar na cavidade oral, iniciando pelo ducto granular, passando pelo ducto intercalar chegando até o ducto excretor. Durante esse percurso sua composição é alterada, havendo principalmente uma reabsorção de água, sódio e cloro.

A secreção salivar realizada pelas glândulas salivares é controlada por impulsos nervosos simpáticos e parassimpáticos, além deles alguns hormônios

também podem exercer controle sobre as glândulas para dar início ao processo de exocitose e secreção de saliva (BAUM; COLPO; FILBURN, 1981). O estímulo simpático produz uma saliva rica em muco e enzimas, enquanto o estímulo parassimpático a saliva produzida é rica em água e eletrólitos (GARRETT; ANDERSON, 1991).

2.2 Metabolismo do glicogênio e as glândulas salivares

2.2.1 metabolismo do glicogênio

Para todo tipo de atividade que nosso corpo exerce, seja ela física ou fisiológica, é necessário energia. A forma como obtemos energia é através da nossa alimentação e, após a digestão, ficam presentes no sangue grandes concentrações de glicose que serão utilizadas como fonte de energia.

A glicose é uma molécula constituída por 6 átomos de carbonos, 12 átomos de hidrogênios e 6 átomos de oxigênios ($C_6H_{12}O_6$) que quando metabolizada fornece energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). O armazenamento da glicose é muito importante pois mesmo nos períodos de jejum nosso corpo necessita de energia e por isso nós armazenamos glicose na forma de um polímero

chamado de glicogênio. Ele é mobilizado nos períodos de jejum para disponibilizar a glicose as células do nosso organismo, além de manter a glicemia nos períodos de jejum.

O órgão que mais armazena glicogênio é o fígado, pois é ele o responsável pela regulação da glicemia. Os músculos também armazenam grandes quantidades de glicogênio, porém a sua utilização é voltada para fins próprios durante atividades físicas. (FERRER et al., 2003)

O glicogênio possui um peso molecular de aproximadamente 10^7 Da, apresenta uma cadeia aproximada de 1-11 resíduos de glicosil, sendo que uma molécula de glicogênio tem cerca de 4000 cadeias de glicosil (LOMAKO; LOMAKO; WHELAN, 1991). As cadeias lineares são feitas por ligações alfa-1,4 e as ramificações por ligações alfa-1,6 (DEVLIN, 1998).

A síntese (glicogênese) e degradação (glicogenólise) do glicogênio ocorre principalmente pela ação de duas enzimas, a glicogênio sintase e a glicogênio fosforilase, respectivamente. A síntese de glicogênio sempre é realizada a partir de um agente iniciador que pode ser o próprio glicogênio ou na sua ausência a glicogenina. A partir do agente iniciador a glicogênio sintase passa a unir resíduos de glicosil ao glicogênio através de ligações alfa-1,4 formando uma cadeia de glicosil que quando passa a constituir 11 resíduos a enzima ramificadora quebra esse ramo e o transfere para outra cadeia ramificando a molécula de glicogênio, formando ligações alfa-1,6 (DEVLIN, 1998).

O controle e a regulação de síntese e degradação do glicogênio são realizados por efetores alostérico e modificações covalentes. O ATP é um inibidor alostérico, enquanto, o AMPc é um ativador. Esses dois efetores vão regular a

atividade da glicogênio fosforilase convertendo para forma ativa ou inativa. Os responsáveis por essa interconversão é a fosforilase quinase e a fosfoproteína fosfatase que também são reguladas pelos mesmos mecanismos.

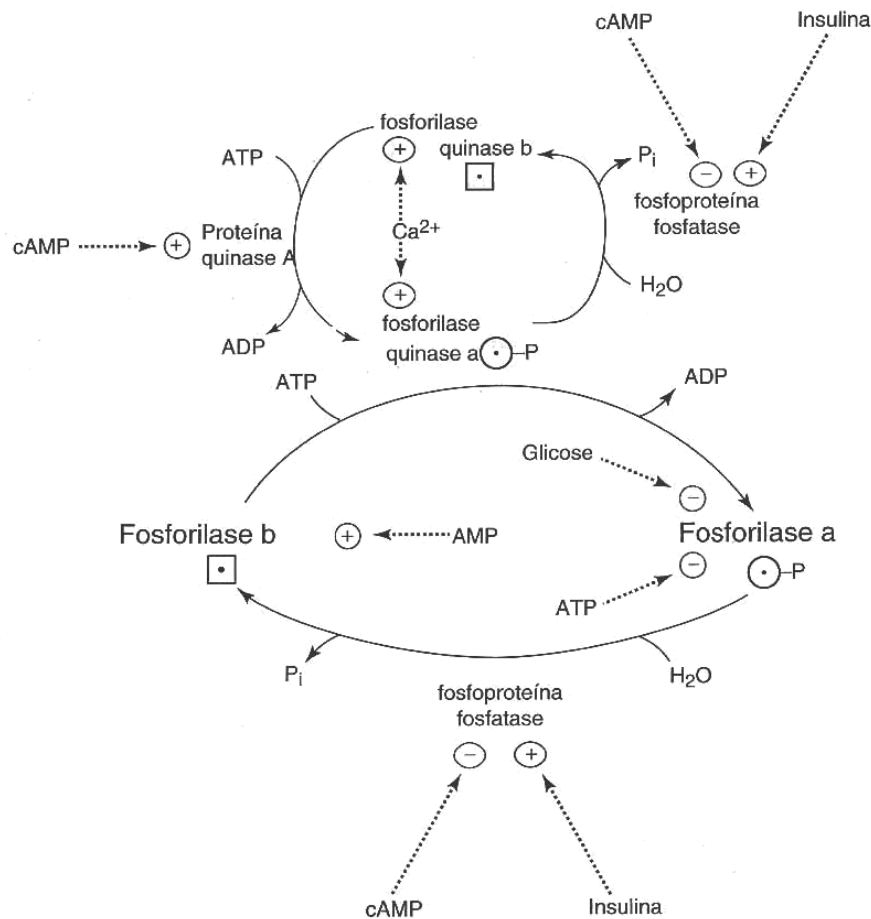


Figura 2.1 – Mecanismo de regulação da enzima glicogênio fosforilase. (DEVLIN, 1998)

A glicogênio sintase também possui as formas ativa (desfosforilada) e inativa (fosforilada) e estão sujeitas a regulação alostérica. A forma inativa é convertida através de quinases que realizam a sua fosforilação, que por sua vez são reguladas por segundos mensageiros da ação hormonal, incluindo AMPc. A desfosforilação é realizada pela fosfoproteína fosfatase que tem como ativador a insulina (DEVLIN, 1998).

ocorrendo a síntese de glicogênio. Nas glândulas salivares a insulina modula os níveis de AMPc causando uma diminuição de fosforilação em enzimas dependentes de AMPc, assim alterando a atividade enzimática por mecanismos ainda não esclarecidos.

O glucagon vai agir de maneira inversa, sendo liberado pelo pâncreas quando a glicemia estiver baixa, aumentando o AMPc no fígado que promove a ativação da proteína quinase dependente de AMPc e a conseqüente fosforilação da fosforilase quinase para a ativação da glicogênio fosforilase (GP) iniciando a glicogenólise. (DEVLIN, 1998)

2.2.2 o glicogênio nas glândulas salivares

Alguns estudos já mostraram o consumo de glicogênio pelas glândulas salivares durante o processo de secreção (FAVA-DE-MORAES; NICOLAU, 1975; NICOLAU; DE SOUZA; MARTINS, 1992; ROSSIGNOL et al., 1974). Foi observada também a mobilização do glicogênio na produção de saliva estimulada nos grânulos de secreção dos ductos granulares da SM de ratos, (GARRETT et al., 1994; THOMOPOULOS; GARRETT; PROCTOR, 2002). Outros estudos mostraram que a degradação do glicogênio em glândulas salivares é diferente dependendo do tipo de estímulo simpático ou parassimpático, ocorrendo uma maior mobilização no estímulo parassimpático (GARRETT; KIDD, 1975; GARRETT; ANDERSON, 1991).

O metabolismo de glicogênio apresenta algumas diferenças entre as glândulas salivares. Em camundongos tratados com isoproterenol (IPR-agonista β -adrenérgico) o conteúdo de glicogênio se comportou de maneira diferente nas glândulas salivares maiores (SM, SL e PA), sendo que após a sua administração o glicogênio atingiu um valor mínimo em 2 horas na PA e em 6 horas na SM e SL. Após 12 e 24 horas o glicogênio retornou os valores normais na PA e SL. Na SM após 18 horas o glicogênio alcançou o dobro do glicogênio controle (FAVA-DE-MORAES; NICOLAU, 1975).

Na SM de ratos tratados com pilocarpina (agonista muscarínico) foi possível verificar uma recuperação do conteúdo de glicogênio após o estímulo. No estudo se verificou que após 30 minutos da injeção ocorreu uma diminuição de 60% no conteúdo de glicogênio, sendo que com o passar do tempo, 60 e 120 minutos após a injeção, a diminuição foi de 35 e 22%, respectivamente, mostrando a recuperação do glicogênio degradado, embora ainda não tenha alcançado níveis semelhantes ao controle (NICOLAU; DE SOUZA; MARTINS, 1992).

2.3 Diabetes mellitus e sua influência na cavidade oral

2.3.1 Diabetes Mellitus

A incidência do diabetes no mundo vem aumentando consideravelmente no decorrer dos anos devido a vários fatores, entre eles estão o aumento populacional, expectativa de vida aumentada, maior número de sedentários e obesos (WILD et al., 2004). O diabetes *mellitus* é uma manifestação clínica resultante de uma deficiência absoluta ou relativa da insulina, provocando um aumento da glicemia dando origem a algumas complicações sistêmicas no organismo.

Existem vários tipos de diabetes, porém os dois principais tipos são o tipo I e o tipo II. O diabetes tipo I é causado por uma reação auto-imune e destruição nas células β das ilhotas de Lagerhans do pâncreas. O tipo II é causado por uma deficiência de sensibilidade dos receptores de insulina ou deficiência na produção de insulina, os dois tipos de diabetes estão associados a fatores genéticos e ambientais como fatores etiológicos (MASHARANI, 2001).

O diabetes pode apresentar diversas manifestações clínicas, sendo as principais a polifagia, poliúria, polidipsia e hálito cetônico causado pela presença de corpos cetônicos no sangue que são eliminados na respiração. As manifestações do diabetes causados pela hiperglicemia crônica são retinopatias, insuficiência renal

crônica, disfunção autonômica sensitiva, motora e outras neuropatias, dificuldade de oxigenação dos tecidos que podem levar a gangrenas, arteriosclerose, microanginas e macroangiopatias (BROWNLEE, 1994).

Os tratamentos utilizados para o diabetes são diversos, podendo ser feito através do controle da dieta, administração de insulina, uso de agentes hipoglicemiantes, ou pela integração desses tratamentos (MASHARANI; RUSHAKOFF, 2009).

Os estudos com diabetes utilizando animais são realizados com drogas que induzem o diabetes destruindo as células β do pâncreas, são elas a estreptozotocina e aloxana (LENZEN, 2008).

O diabetes provoca uma grande quantidade de desordens metabólicas. Uma delas é o aumento do estress oxidativo que no diabético está muito aumentado havendo relação com algumas das complicações associadas a essa doença (ROLO; PALMEIRA, 2006).

2.3.2 interferência do diabetes nas glândulas salivares

O diabetes atinge diversos órgãos, entre eles estão as glândulas salivares que são os órgãos responsáveis pela secreção salivar e possuem grande importância na manutenção da saúde bucal além de colaborar em outras funções da

cavidade oral como na fala e alimentação. As manifestações bucais associadas a essa moléstia estão a hipossalivação, xerostomia, disfunções salivares e glandulares, gengivite, periodontite, abscessos dentais, candidíase e freqüentemente lesões na mucosa e língua (CARDA et al., 2006; DARNELL; SAUNDERS, 1990; SHIP, 2003).

A xerostomia é um sintoma frequentemente relatado por pacientes diabéticos que pode ou não estar associado a hipossalivação, por esse motivo muitos trabalhos tem a finalidade de estudar a influência do diabetes em glândulas salivares. Em 1981, Anderson e colaboradores mostraram que após 40 dias da indução do diabetes em ratos ocorreu uma diminuição do peso corpóreo e glandular, da atividade da enzima peroxidase e da proteína total na parótida e a aplicação da insulina restaurou os parâmetros alterados até próximos aos níveis encontrados nos animais controle. (ANDERSON; JOHNSON, 1981)

Em estudos realizados em humanos, percebemos que os sintomas, como a xerostomia, estão presentes nos diabéticos, porém quanto ao fluxo salivar não se tem um consenso da sua alteração. Esses estudos nos mostra que os resultados obtidos são conflitantes, alguns encontram uma hipofunção e diminuição da secreção nos diabéticos (BANOCZY et al., 1987; BEN-ARYEH et al., 1988; BOWEN, 1987; CHAVEZ et al., 2000; HARRISON; KJELLMAN, 1970; THORSTENSSON et al., 1989) e outros não observaram alterações (DODDS; DODDS, 1997; MARDER; ABELSON; MANDEL, 1975; MEURMAN et al., 1998; LAMEY; DARWAZEH; FRIER, 1992; NARHI et al., 1996; SHARON et al., 1985).

Estudos com animais diabéticos nos mostra alterações nas glândulas salivares, porém quanto ao fluxo salivar os resultados permanecem conflitantes. Em camundongos, após 2 semanas da indução do diabetes, ocorreu uma diminuição da

secreção de saliva total de aproximadamente 50% quando estimulada com pilocarpina ou isoproterenol e não alterou quando estimulada com felinefrina (MURAI et al. 1996) concordando com os dados obtidos por Vatta et al. (2002) (VATTA et al., 2002), porém alguns estudos encontraram um aumento (ANDERSON; GARRETT, 2004) e outros não encontraram alteração (WATANABE; YAMAGISHI-WANG; KAWAGUCHI, 2001) do fluxo salivar.

O sistema antioxidante das glândulas salivares e da saliva, assim como no resto do organismo, parece ser bastante afetado pelo estado diabético, porém cada glândula responde de maneira distinta. As glândulas SM apresentaram um aumento do conteúdo de malondialdeído, indicativo da peroxidação lipídica, e aumento da glutathione reduzida e oxidada, enquanto que as PA apresentaram um aumento da atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase (NOGUEIRA et al., 2005). Em estudo com a saliva de pacientes diabetes do tipo 1 foi encontrado um aumento da atividade das enzimas peroxidase, superóxido dismutase (SOD) e o status total de antioxidante (TAS), havendo uma correlação da severidade e tempo de doença com o aumento do estress oxidativo (REZNICK et al., 2006).

O metabolismo de carboidratos em glândulas salivares de ratos diabéticos a literatura já mostrou ser alterado. Em um estudo foi observado que a atividade da hexoquinase de glândulas PA e SM de ratos diabéticos apresentaram redução 30 dias após a indução estreptozotocina (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005). Em SM foi relatada aumento da atividade da enzima fosfofrutoquinase-1 (PFK-1), redução da atividade da enzima fosfofrutoquinase-2 (PFK-2), bem como metabólito frutose-2,6 bifosfato (Fru 2,6 P2), neste mesmo período experimental. Nenhuma diferença na atividade destas enzimas foi encontrada na PA (NICOLAU; SOUZA; NOGUEIRA, 2006).

2.3.3 Diabetes e o glicogênio

A interferência do diabetes no metabolismo de carboidratos é bem evidente. Estudos com adultos diabéticos tipo 1 e com controle moderado da doença mostrou uma redução de 30% no armazenamento de glicogênio em fígado (HWANG et al. 1995), porém em outro estudo com jovens portadores do diabetes tipo 1, ocorreu uma diminuição do armazenamento, porém sem diferença estatisticamente significativa (MATYKA et al., 2001), o que pode ser explicado pelas diferentes metodologias adotadas, tempo do indivíduo com a doença e a própria diferença de idade entre os participantes de cada estudo.

Nas glândulas salivares de ratos diabéticos sacrificados 60 dias após a indução por estreptozotocina, foi observada uma maior concentração de glicogênio nas PA (130%), e nas SM (27%) quando comparadas com os ratos controle. A enzima glicogênio fosforilase em SM reduziu sua atividade em aproximadamente 68%, enquanto que nas PA essa redução foi de 79%. A glicogênio sintase aumentou sua atividade em pelo menos 64% nas SM e 75% nas PA (NICOLAU et al., 2005).

Na literatura não encontramos muitos trabalhos que mostrem uma alteração no metabolismo de glicogênio em glândulas salivares com animais no estado diabético, porém os poucos trabalhos que existem sugerem a existência de um comprometimento.

2.4 Ritmo circadiano e a secreção salivar

2.4.1 ritmo circadiano

Devido aos movimentos da Terra somos submetidos a períodos de claro e escuro que juntos compõem as 24 horas do dia. A variação desses períodos ocorre em cada época do ano onde observamos dias mais longos durante o verão, que se tornam gradualmente mais curtos conforme chega o inverno. Quando esses ciclos de presença e ausência de luz são determinados por nosso organismo, é estabelecido um ritmo biológico particular de cada indivíduo conhecido como ritmo circadiano (MILLS, 1966).

A determinação do ritmo circadiano se dá pelo núcleo supraquiasmático, localizado na porção anterior do hipotálamo através da sensibilização pela luz de fotoreceptores localizados na retina (SKENE et al., 1999). Ao estabelecer esse ritmo ele interfere na secreção de diversas substâncias endógenas do nosso organismo entre elas estão a melatonina e o cortisol (BERRA; RIZZO, 2009; SKENE; LOCKLEY; ARENDT, 1999), que também são usados em estudos como marcadores de alterações no ritmo circadiano e do estresse, respectivamente. Alguns trabalhos já mostraram a variação circadiana de alguns hormônios como insulina, glucagon, interferindo assim no metabolismo dos carboidratos (RUITER et al., 2003) e da própria glicemia (LA FLEUR, 2003).

Qualquer variação na duração dos ciclos de claro e escuro podem interferir em nosso ritmo circadiano, por esse motivo povos que vivem próximos aos trópicos, onde os períodos de dia e noite são praticamente iguais durante todo o ano possuem um ritmo circadiano bem definido, sem grandes alterações entre as diferentes estações climáticas do ano. Povos que vivem perto dos pólos, onde há grandes mudanças durante o ano na duração do dia e da noite, possuem um ritmo diferente que se ajusta conforme o dia vai aumentando ou diminuindo.

A alteração rápida desses ciclos é muito estudada e ocorre principalmente quando viajamos longas distâncias, cruzando diversas faixas do fuso horário de uma vez, não dando tempo para que nosso ritmo circadiano seja ajustado. Os sintomas desse desajuste do nosso relógio biológico são insônia, preguiça, distúrbios gastrointestinais entre outros. Essa desordem foi denominada jet lag (SACK, 2009).

2.4.2 Ritmo circadiano no processo de secreção salivar

O ritmo circadiano atua em diversos processos fisiológicos. Na cavidade oral podemos observar sua interferência na alteração da concentração de várias substâncias da saliva (DAWES, 1974).

Uma das alterações de grande relevância na cavidade oral é a variação do fluxo salivar, aumentando seu volume durante o dia, atingindo um pico durante à

tarde e caindo a níveis perto de zero durante a noite, quando estamos dormindo (DAWES, 1974). A significativa diminuição da secreção salivar durante a noite pode estar relacionada a variação circadiana de um outro hormônio, o hormônio anti-diurético (KAKKAR et al., 1997), que Junqueira, Fava-de-Moraes e Toledo (1967) mostraram que a sua injeção em humanos provoca a diminuição do fluxo salivar (JUNQUEIRA; FAVA-DE-MORAES; TOLEDO, 1967). Outros estudos mostraram que sua concentração é aumentada durante a noite (MILLS, 1966).

Dawes em 1972 mostrou que a composição salivar e a temperatura bucal, assim como o fluxo salivar, também se altera conforme o ritmo circadiano, variando conforme a hora do dia analisada (DAWES, 1972). Outro estudo mostra também que o fluxo salivar também varia de acordo com a época do ano seguindo um ritmo circanual (KARIYAWASAM; DAWES, 2005).

Esses trabalhos mostraram a importância da padronização de um horário nos estudos que são realizados na cavidade oral e seus produtos.

3 PROPOSIÇÃO

O glicogênio é uma molécula utilizada para armazenar glicose e é utilizado como fonte de energia durante os períodos de jejum. Nas glândulas salivares ele está envolvido no processo de secreção salivar ocorrendo sua degradação para obtenção de energia. Sabendo que o processo de secreção salivar é alterado durante o dia devido ao ritmo circadiano, decidimos examinar a variação da concentração de glicogênio em glândulas parótidas e submandibulares de ratos, no primeiro momento com diferentes idades e em diferentes condições alimentares, e em uma segunda etapa com ratos diabéticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi verificado a concentração de glicogênio em glândulas salivares de ratos normais, durante o dia, com diferentes idades (21, 30 e 60 dias de vida), e em diferentes condições alimentares. Na segunda etapa foi analisada a concentração de glicogênio em glândulas salivares de ratos diabéticos durante 30 dias.

Foram usados ratos da raça wistar, os animais normais foram divididos em 21, 30 e 60 dias de vida. Dentro dessas idades, eles foram subdivididos em um grupo com livre acesso ao alimento e outro grupo restrito a alimentação noturna, onde 2 dias antes do sacrifício a alimentação dos ratos era restrita ao período noturno (19 as 7 horas). O sacrifício de todos os grupos foi feito em um período de 12 horas (7 as 19 horas) com intervalo de 2 horas entre eles, obtendo assim grupos das 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 horas.

4.1.2 indução do diabetes

No grupo diabético foram utilizados ratos com 60 dias de vida e a indução do diabetes foi realizada através de uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (65 mg/Kg p.c.) dissolvido em tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,5 após um jejum de aproximadamente 15 horas. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia em jejum igual ou superior a 250 mg de glicose/dL de sangue. Após 30 dias os animais foram sacrificados e a glicemia mensurada no momento do sacrifício. O sacrifício foi realizado as 7, 9, 11, 13, 15, 17 e 19 horas.

4.2 Obtenção das amostras

Após a anestesia com pentobarbital sódico (50 mg/Kg p.c.) e hidrato de cloral (400 mg/Kg p.c.) os ratos foram sacrificados por destroncamento cervical e as glândulas salivares imediatamente removidas, limpas de tecido aderente, prensadas em lâminas de alumínio previamente resfriadas em gelo seco e armazenadas em freezer -80°C até o momento das análises.

4.3 Determinações

4.3.1 determinação da glicemia

A glicemia foi determinada através do glicosímetro Accu-Chek Advantage II (Roche).

4.3.2 determinação do glicogênio glandular

A determinação da concentração do glicogênio glandular foi realizada de acordo com o método proposto por Singh e Venkitasubramanin (1976). Foram utilizados aproximadamente 60mg de tecido glandular para as análises, que foram digeridas em hidróxido de potássio 30% em banho fervente por 30 minutos. Após a digestão, o isolamento do glicogênio foi realizado através da adição de solução de sulfato de sódio (Na_2SO_4) saturada em etanol 95%. A mistura foi mantida em ambiente a 4°C por 15 minutos, centrifugada a 3020g (5000 RPM) por 20 minutos e o sobrenadante desprezado. Durante o processo de purificação do glicogênio isolado foi utilizado ácido tricloroacético (TCA) 5% como reagente desproteinizante, etanol absoluto, solução etanol/éter 3:1 e finalmente éter sulfúrico. Entre cada tratamento o material foi centrifugado a 3020g por 20 minutos sendo o sobrenadante descartado e o precipitado utilizado. O sedimento de glicogênio foi diluído em água

e a dosagem do glicogênio foi realizada através de uma titulação com reagente de antrona 0,2% em ácido sulfúrico concentrado e levado ao banho-maria em água fervente por 10 minutos. Para todo o experimento foi utilizado um padrão de glicose (1mg/mL) durante as análises. Após o banho a amostra foi resfriada e levada ao espectrofotômetro Beckman DU 68, onde foi feita a leitura a 620 nm, utilizando cubetas de 3 mL e caminho ótico de 1 cm. (SINGH; SINGH; VENKITASUBRAMANIAN, 1976)

Para os cálculos foi utilizada a seguinte formula:

$$\text{Concentração de glicogênio no tecido} = \frac{\text{Abs x [] padrão}}{\text{Mg tecido x 1,11 x Abs padrão}}$$

Onde “Abs” é o valor da absorbância obtida na leitura da amostra no espectrofotômetro; “[] padrão” é a concentração usada no padrão (igual a 20); “Mg tecido” foi a quantidade de tecido da amostra utilizada em miligramas; “1,11” é uma constante para realização do cálculo; e “Abs padrão” é o valor obtido no espectrofotômetro na leitura do padrão.

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas da comparação das concentrações de glicogênio entre os grupos foram feitas utilizando os testes t de Student, ANOVA e de Tukey, foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados em ratos normais com diferentes idades

A figura 5.1 nos mostra a variação da concentração de glicogênio nas glândulas SM de ratos durante o dia (entre 7 e 19hs) nos 3 diferentes grupos divididos por idade (21, 30 e 60 dias de vida) nas mesmas condições alimentares (sem restrição alimentar). Nesta glândula, o fator idade influenciou na concentração do glicogênio somente em 1 dos 7 períodos estudados, o das 15hs, onde foi observada uma redução nos animais com 60 dias de vida, quando comparados aos outros 2 grupos.

Além disso, os grupos com 21 e 30 dias se comportaram de forma semelhante tendendo a uma queda da concentração de glicogênio após as 15 horas até o final do dia (19 horas). Já o grupo de 60 dias exibiu uma oscilação da concentração do glicogênio, caindo após as 11 horas até as 15 horas quando foi encontrado o menor nível de glicogênio do período analisado. Voltou a subir as 17 horas e caiu as 19 horas.

No grupo de 21 dias a concentração de glicogênio oscilou até as 15 horas, mas sem diferença significativa. Após esse horário ela passa a cair alcançando seu menor valor do dia as 19 horas, existindo uma variação de aproximadamente 50% do maior para o menor valor encontrado.

Nos animais com 30 dias de vida a concentração do glicogênio começou o dia com o maior valor encontrado, mas logo as 9 horas cai e passa a manter o nível

de glicogênio constante até as 15 horas. Depois desse período há uma nova queda chegando ao menor valor do dia as 19 horas, variando aproximadamente 48% do começo ao fim do dia.

No grupo de 60 dias a concentração do glicogênio oscilou durante a manhã até 11 horas, quando alcançou a maior concentração do dia. Em seguida há uma queda até as 15 horas quando foi obtido um valor semelhante ao observado as 19hs, porém inferior ao das 17hs.

A figura 5.2 nos mostra a variação da concentração de glicogênio nas glândulas PA de ratos durante o dia (entre 7 e 19hs) nos 3 diferentes grupos divididos por idade (21, 30 e 60 dias de vida) nas mesmas condições alimentares (sem restrição alimentar). Diferente da glândula SM, observamos diferença significativa entre as idades as 9, 11, 13, 15 e 17 horas. Nos animais com 21 dias existiu uma oscilação da concentração de glicogênio sendo significativa essa diferença entre os valores encontrados as 11 e 15 horas com o das 13 horas, onde houve uma queda de 66% que logo se elevou subindo 149%. A variação da concentração do início do dia (7hrs) para a concentração encontrada no final do dia (19hrs) não houve diferença significativa entre eles.

No grupo de 30 dias existiu uma variação ao longo do dia, tendo a concentração mais elevada as 13 horas e as menores no início e final do dia. A concentração de glicogênio no grupo de 60 dias apresentou queda constante das 7 as 15 horas, mas 17 horas ocorreu um aumento significativo de 173% em relação ao horário anterior que foi mantido até as 19 horas.

Quando imposta a restrição de alimento o metabolismo do glicogênio nas glândulas submandibulares foram semelhante nos 3 grupos (21, 30 e 60 dias). Na figura 3 observamos maiores valores de glicogênio nas primeiras horas (7 e 9 horas)

passando a cair gradualmente até as 19 horas, quando atingiu os menores valores. A queda da concentração de glicogênio entre 7 e 19 horas foi de aproximadamente 52% no grupo de 21 dias, 71% no de 30 dias e 67% no de 60 dias. Foi encontrada diferença significativa entre os grupos as 7 horas, onde o grupo de 21 e 30 dias foi diferente do de 60 dias. As 9 horas entre o grupo de 30 dias com o de 21 dias, as 13 e 19 horas houve uma diferença entre o grupo de 21 dias e de 60 dias.

Na figura 5.4 observamos que nas glândulas PA a oscilação da concentração de glicogênio durante o dia nos grupos de 21 e 60 dias quase não ocorreu. No grupo de 21 dias a concentração se mantém estável até as 15 horas, quando passa a cair, ocorrendo uma queda significativa de aproximadamente 35% após este horário. No grupo de 60 dias a variação é pequena mantendo a concentração de glicogênio em níveis semelhantes durante praticamente todo o dia.

Somente no grupo de 30 dias foi observado uma grande elevação da concentração de glicogênio as 7 e 9 horas. Após esse período há uma tendência de queda da concentração do glicogênio até as 19 horas, reduzindo aproximadamente 60% do glicogênio inicial. Entre as idades em uma mesma hora existiu uma diferença, as 7 e 9 horas do grupo de 30 dias com os demais, sendo este mais elevado. As 11 horas houve diferença entre o grupo de 21 dias com o de 30 dias, e foi encontrada diferença entre o grupo de 30 com o de 60 dias as 13 e 19 horas.

As figuras 5.5, 5.6 e 5.7 ilustram a comparação entre os animais com e sem a restrição de alimento em glândulas submandibulares dos ratos normais com 21, 30 e 60 dias. Nestas figuras observamos que a restrição de alimento interferiu somente em alguns horários no conteúdo de glicogênio das glândulas salivares dos ratos com 21 e 30 dias de vida, havendo diferença significativa somente as 9 e 15 horas no grupo com 21 dias, sendo que as 9 horas o grupo com restrição obteve valores

maiores do que os animais sem restrição e as 15 horas ocorreu o inverso. No grupo de 30 dias somente as 17 horas ocorreu uma maior concentração nos animais sem restrição de alimento. Já nos animais com 60 dias só não houve diferença as 7 e as 15 horas, onde foram encontradas as maiores concentrações de glicogênio nos animais sem restrição de alimento as 11, 17 e 19 horas. As 9 e 13 horas as maiores concentrações foram dos animais com restrição de alimento.

As figuras 5.8, 5.9 e 5.10 comparam as concentrações de glicogênio das glândulas parótidas de ratos submetidos ou não a restrição alimentar nos diversos períodos do dia, separados pela idade, mostrando que a condição alimentar interferiu principalmente no grupo de 60 dias de vida, onde encontramos diferença significativa entre os grupos das 9, 11, 13, 15 e 19 horas, havendo sempre uma maior concentração de glicogênio no grupo com restrição alimentar. No grupo de 21 dias a restrição influenciou, somente as 13 horas, onde encontramos uma diferença significativa entre eles com maior valor encontrado nos animais com restrição alimentar. Nos animais com 30 dias observamos uma maior concentração nos períodos iniciais (7, 9 e 11 horas) nos animais submetidos a restrição alimentar.

5.2 Resultados em ratos diabéticos

Quando observamos os resultados das SM dos ratos diabéticos podemos ver na figura 5.11 que o estado diabéticos levou a uma redução na concentração de glicogênio significativa as 7, 9, 11 e 17 horas. Além disso, no grupo diabético não foi observada a oscilação presente nos animais normais que chegou a ter uma

variação de 116% entre os horários com maior concentração para aqueles com menor concentração.

Na figura 12 observamos que o estado diabético promoveu alterações inversas nas glândulas parótidas quando comparadas as glândulas SM, com valores superiores na concentração de glicogênio nos animais diabéticos quando comparados aos dos ratos controles, existindo uma diferença significativa as 9, 11, 13, e 15 horas. Quando observamos a oscilação da concentração durante o dia verificamos que as 13 horas houve um grande aumento de aproximadamente 153% em relação aos outros horários que ficaram em níveis semelhantes entre eles, todos próximos de 0,33 μg de glicogênio/mg de tecido.

Quando comparamos a PA com as SM dos animais diabéticos observamos que nas duas glândulas a maior concentração de glicogênio encontrada foi as 13 horas. Nas SM não houve uma discrepância tão significativa como a observada nas PA com as outras horas do dia, mas foi esse o horário com o maior valor encontrado no período analisado. Já nas glândulas de ratos normais não existiu uma hora onde as duas obtiveram as maiores concentrações, mas a menor concentração de glicogênio encontrada ocorreu no mesmo horário, as 15 horas.

Varição da concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos controles durante o dia sem restrição de alimento

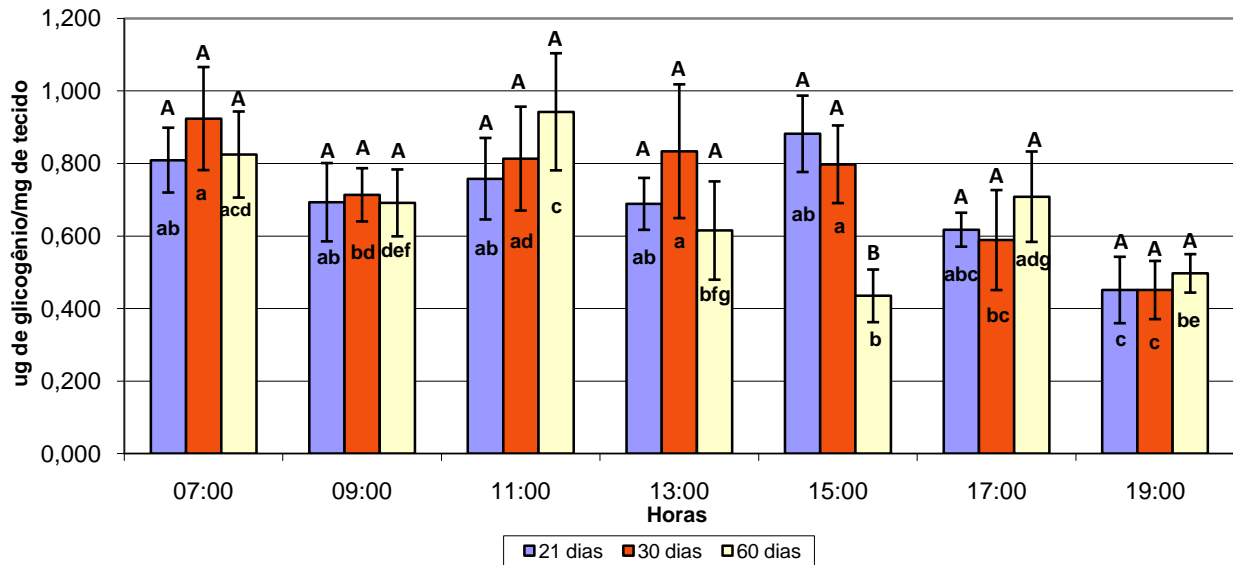


Figura 5.1 - Concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos com 21, 30 e 60 dias de vida, sem restrição de alimento no período das 7 às 19 horas. Letras maiúsculas fazem a comparação dos grupos em uma mesma hora, as letras minúsculas comparam as horas em um mesmo grupo para $p < 0,05$

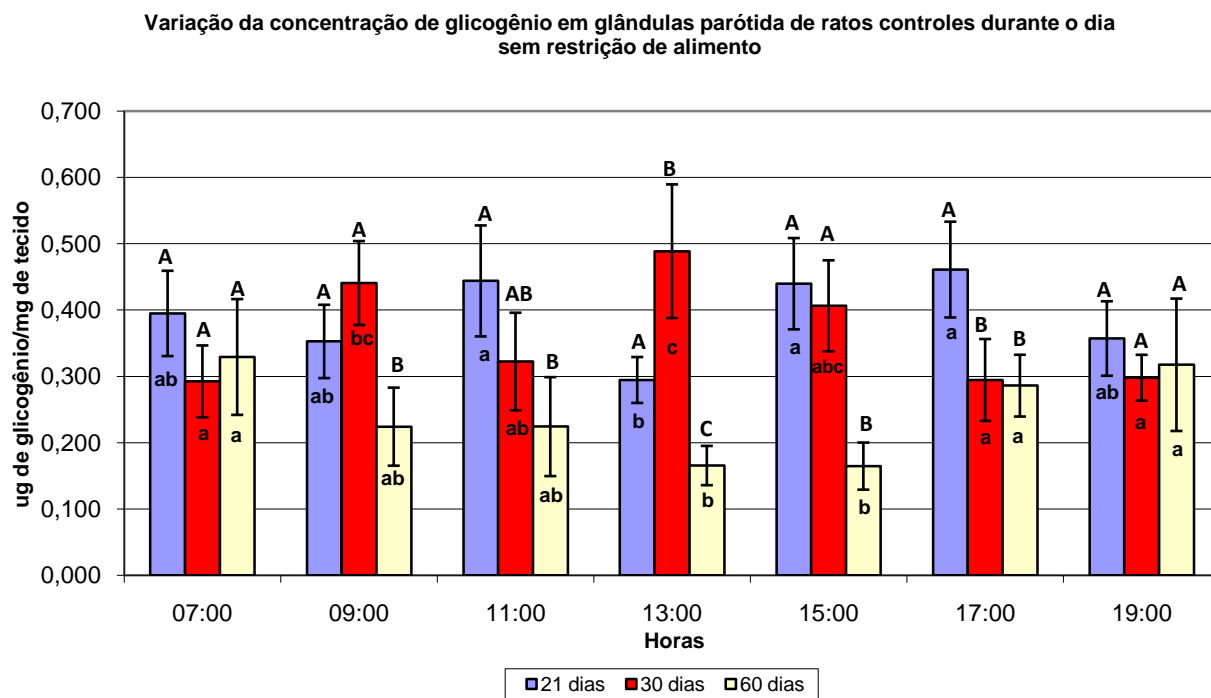


Figura 5.2 - Concentração de glicogênio em glândulas parótidas de ratos com 21, 30 e 60 dias de vida, sem restrição de alimento no período das 7 as 19 horas. Letras maiúsculas fazem a comparação dos grupos em uma mesma hora, as letras minúsculas comparam as horas em um mesmo grupo para $p < 0,05$

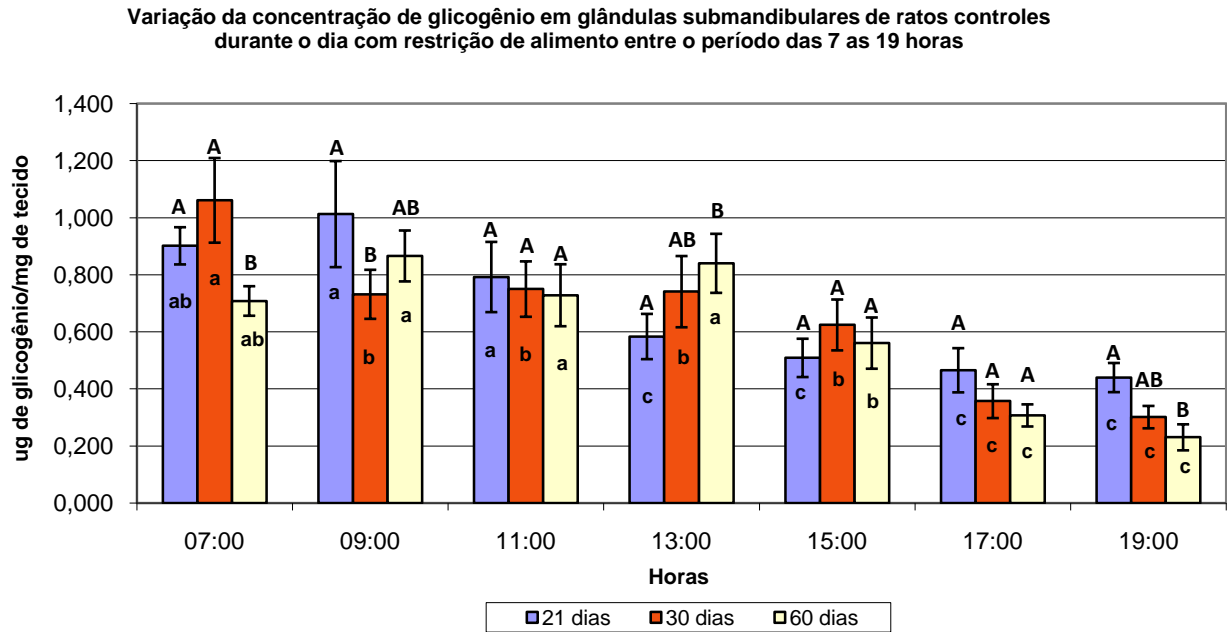


Figura 5.3 - Concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos com 21, 30 e 60 dias de vida, com restrição de alimento no período das 7 as 19 horas. Letras maiúsculas fazem a comparação dos grupos em uma mesma hora, as letras minúsculas comparam as horas em um mesmo grupo para $p < 0,05$

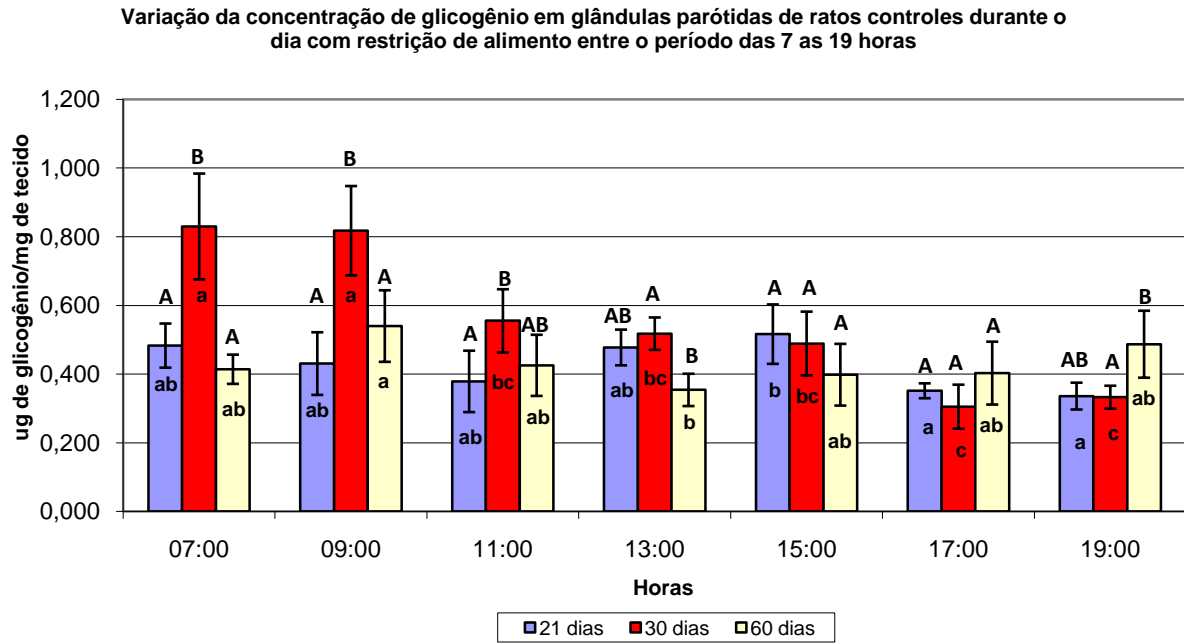


Figura 5.4 - Concentração de glicogênio em glândulas parótidas de ratos com 21, 30 e 60 dias de vida, com restrição de alimento no período das 7 as 19 horas. Letras maiúsculas fazem a comparação dos grupos em uma mesma hora, as letras minúsculas comparam as horas em um mesmo grupo para $p < 0,05$

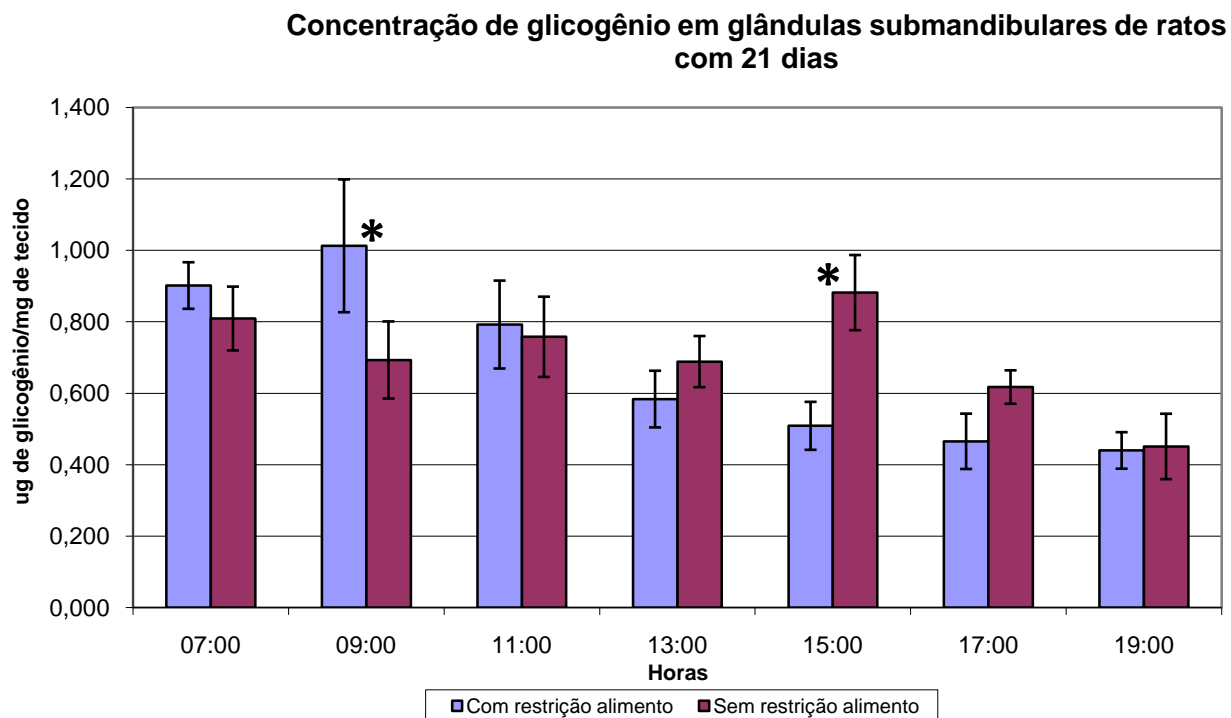


Figura 5.5 - Concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos com 21 dias com e sem restrição de alimento durante o dia. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

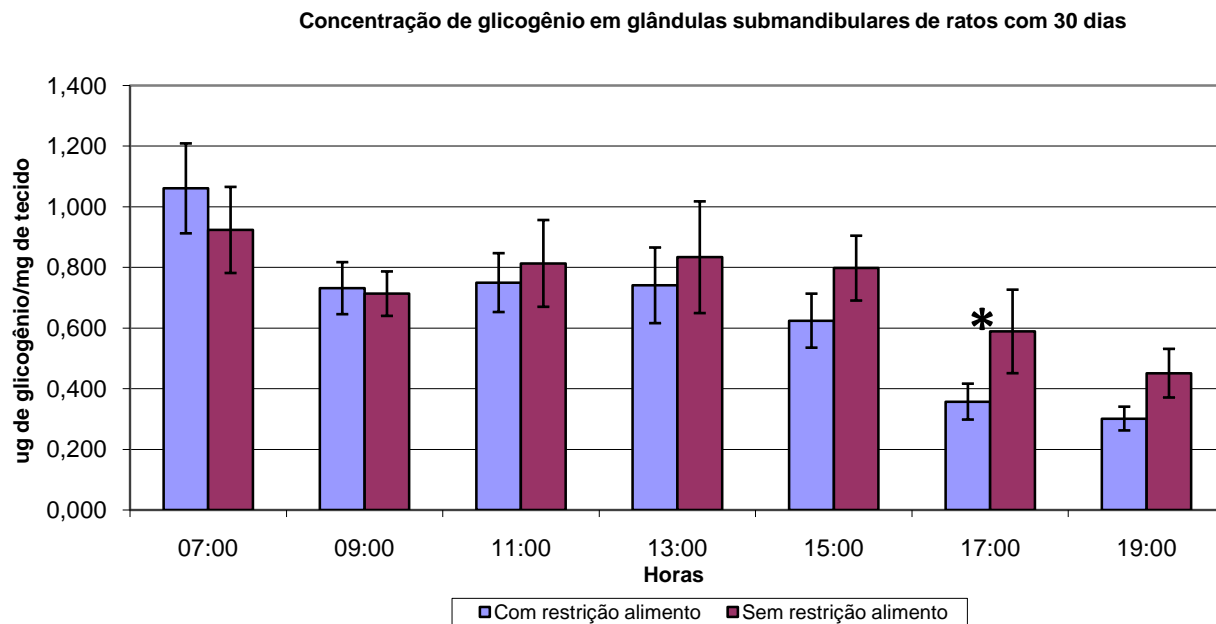


Figura 5.6 - Concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos com 30 dias com e sem restrição de alimento durante o dia. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

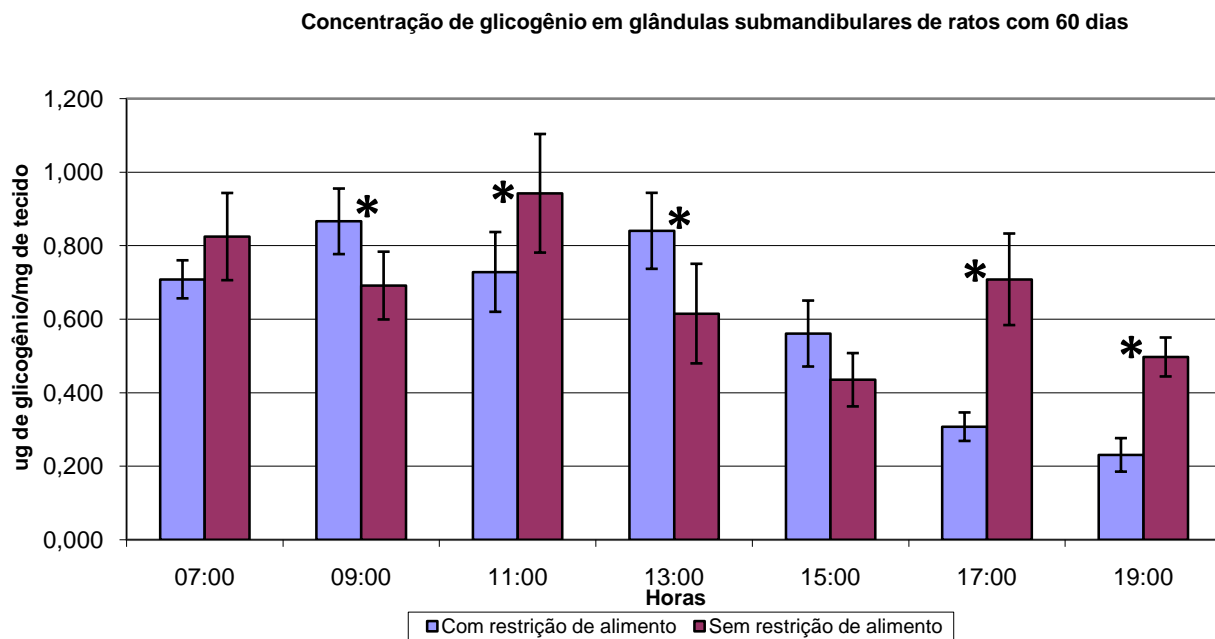


Figura 5.7 - Concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos com 60 dias com e sem restrição de alimento durante o dia. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

Concentração de glicogênio em glândulas parotidas de ratos com 21 dias

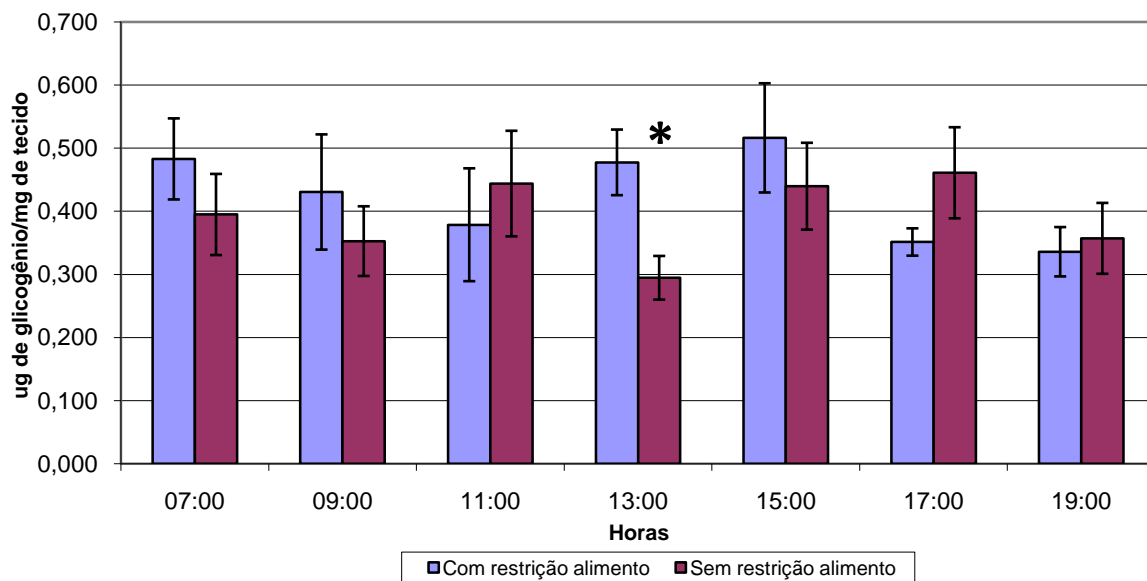


Figura 5.8 - Concentração de glicogênio em glândulas parótida de ratos com 21 dias com e sem restrição de alimento durante o dia. O astertisco representa diferença estatisticamente significativa ente os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

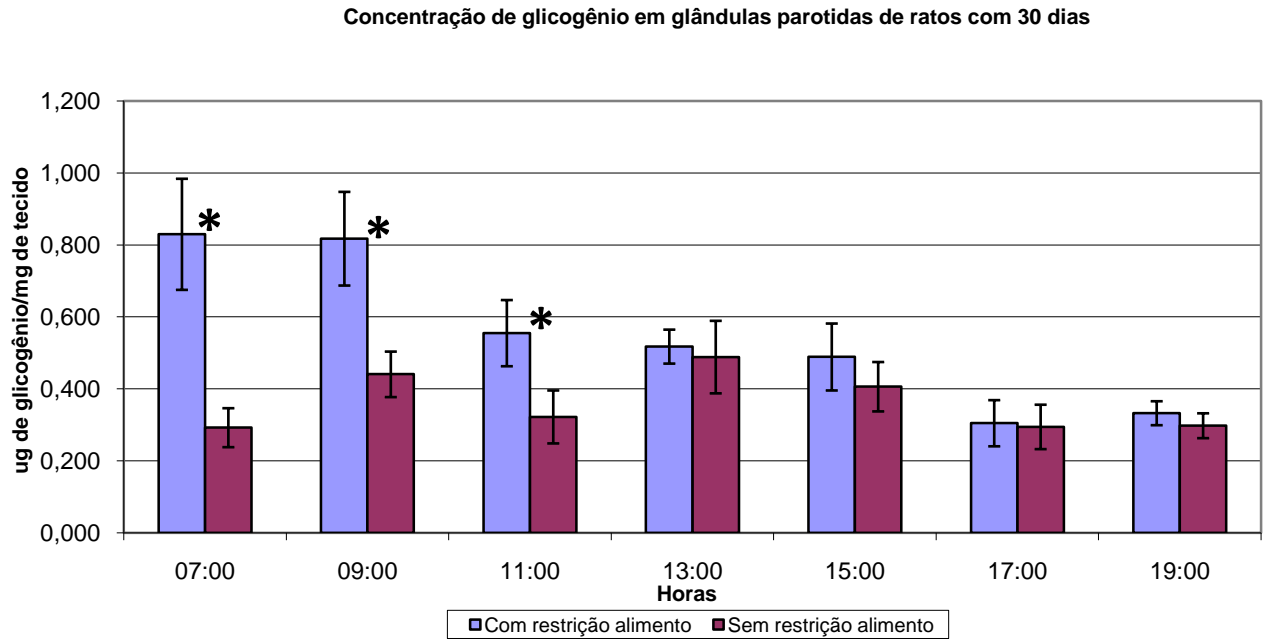


Figura 5.9 - Concentração de glicogênio em glândulas parótida de ratos com 30 dias com e sem restrição de alimento durante o dia. O asterisco representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

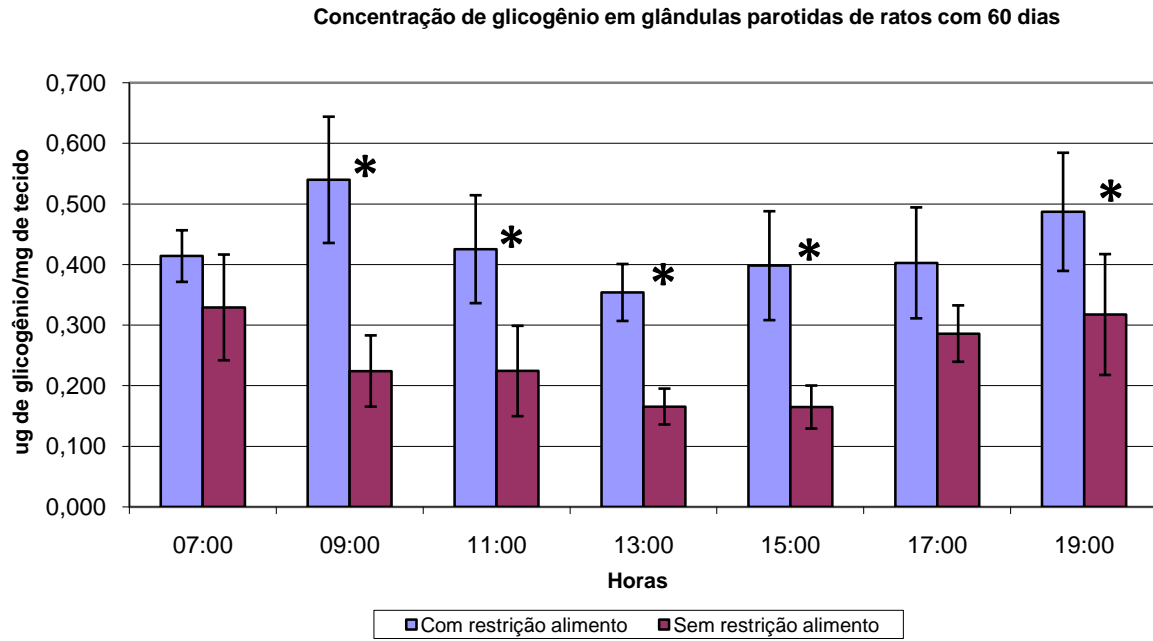


Figura 5.10 - Concentração de glicogênio em glândulas parótida de ratos com 60 dias com e sem restrição de alimento durante o dia. O asterisco representa diferença estatisticamente significante ente os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

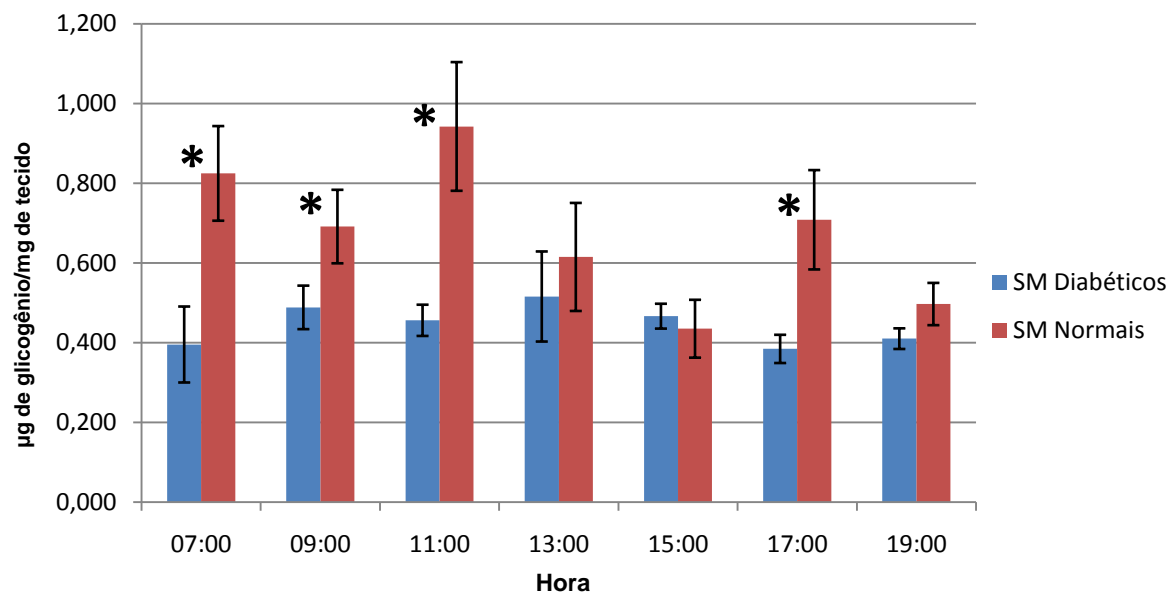


Figura 5.11 - Concentração de glicogênio em glândulas submandibulares de ratos normais e diabéticos durante o dia. * representa diferença estatisticamente significante ente os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

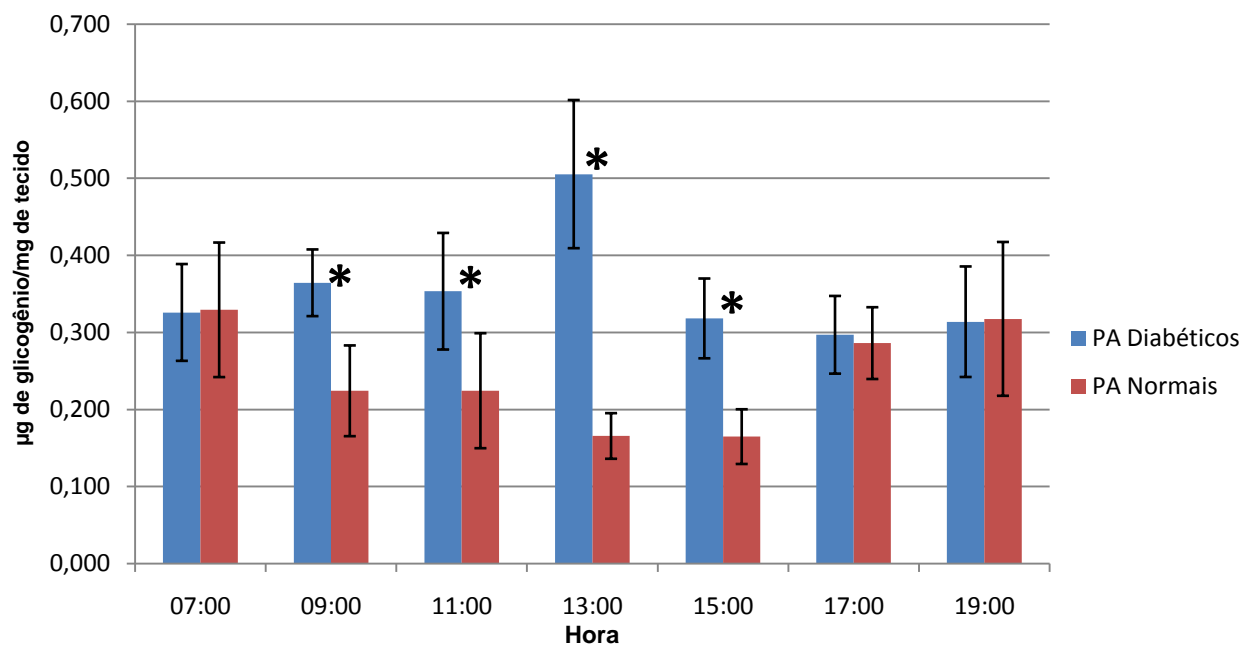


Figura 5.12 - Concentração de glicogênio em glândulas parótidas de ratos normais e diabéticos durante o dia. * representa diferença estatisticamente significante ente os grupos em uma mesma hora para $p < 0,05$

6 DISCUSSÃO

6.1 Experimento com ratos normais com diferentes idades

Estudos sobre o metabolismo de carboidratos em glândulas salivares ainda são poucos e quando nos restringimos ao conteúdo e metabolismo do glicogênio há um número ainda menor de trabalhos que abordam o tema, contudo, esses estudos são importantes para a compreensão da forma como esse órgão, muito importante para manutenção da saúde bucal, obtém e consome energia, e nos casos de anormalidades se ocorre uma interferência nesse processo prejudicando seu funcionamento natural.

Neste estudo analisamos o comportamento da concentração de glicogênio, examinando a variação nas PA e SM de ratos normais e diabéticos observando assim as particularidades de cada uma das glândulas, levando em consideração o ritmo circadiano. Este ciclo interfere em diversas funções de nosso organismo, como por exemplo, o fluxo salivar, diretamente relacionado com o processo de secreção das glândulas, cujo processo envolve gasto de energia e conseqüentemente a mobilização do glicogênio.

Alguns estudos já mostraram as particularidades do metabolismo de carboidratos entre as glândulas parótidas e submandibulares, bem como a diferença no armazenamento e uso do glicogênio por elas (NICOLAU; SASSAKI, 1976; NICOLAU; GANZERLA; DE SOUZA, 2003).

Nesse estudo, ficou evidente a diferença do metabolismo de glicogênio entre as glândulas ao observar a concentração de glicogênio armazenado por elas ao longo do dia.

As glândulas parótidas tem discreta participação durante o repouso, mas aumentam significativamente seu fluxo quando há um estímulo. Esse estímulo pode ser mecânico, causado pela mastigação do alimento, gustativo quando sentimos o sabor do alimento, ou ainda visual ou provocado pelo olfato. Em nosso estudo os animais com 30 e 60 dias de vida tinham sua dieta baseada em ração, sendo portanto a mastigação o principal estímulo para secreção salivar. No grupo de 21 dias, como em nosso biotério os animais ficam com a mãe após o nascimento até completarem 21 dias, até essa idade eles ainda são amamentados iniciando a alimentação por sólidos como a ração, ocorrendo pequena influência da mastigação, predominando a sucção e o paladar como estímulos salivares.

Em nossos experimentos observamos diferenças de comportamento entre as glândulas. Nas PA de animais restritos a alimentação noturna, onde praticamente não ocorreu degradação do glicogênio ao longo do dia, devido provavelmente a ausência do estímulo, se mantendo estável durante um longo período analisado tendendo a uma queda nas horas finais do dia, as 17 e 19 horas. Somente nos animais com 30 dias de vida que foi observada uma alta concentração de glicogênio durante as horas iniciais, 7 e 9 horas que sofreram uma redução mais gradual chegando no final do dia com uma diminuição de aproximadamente 59% do conteúdo de glicogênio armazenado nas primeiras horas. Esses dados provavelmente devem-se ao fato das PA não terem sofrido nenhum tipo de estímulo para secreção, já que os animais não podiam se alimentar durante o dia. Já nos animais de 30 dias de vida esses dados podem ter sido alterados pelo fato desses

ratos estarem no processo de transição da alimentação iniciando a alimentação com comida sólida, pois a partir de 21 dias nós separamos eles da mãe e eles passam a ter a disposição somente a ração para se alimentar e durante sete dias ele deve se habituar a se alimentar exclusivamente dela. Outro fator, talvez mais significativo, é o fato de observarmos que nessa idade eles são mais ativos e verificamos que na ausência de alimento eles roem objetos como a tampa da gaiola, provocando um estímulo para as PA.

O grupo dos animais com livre acesso a comida reforça essa hipótese da ausência de estímulos e manutenção dos níveis de glicogênio nas PA, pois foi possível observar a oscilação da concentração do glicogênio nesse grupo, ficando bem evidente que os animais se alimentavam durante o dia mobilizando o glicogênio para o processo de secreção salivar e depois retorna a sintetizar essa molécula para posterior utilização. Nesse grupo observamos que a idade dos animais interferiu mais nos resultados. Nos animais com 30 e 60 dias é possível ver que existem momentos de degradação e momentos de síntese de glicogênio, ocorrendo alterações significantes entre as horas, o que foi menos evidente nos animais com 21 dias que mantêm a concentração estável de glicogênio durante todo o dia alterando somente as 13 horas tendendo a uma redução do glicogênio. Esses resultados reforçam os achados da literatura os quais mostram que a glândula parótida atinge a fase adulta depois dos 25 dias de idade (SIVAKUMAR et al., 1998), com 21 dias ela ainda está na fase de maturação. Nessa fase ela armazena glicogênio principalmente para seu desenvolvimento e não para secreção salivar (NICOLAU; GANZERLA; DE SOUZA, 2003), talvez por isso não tenha ocorrido variações significantes da concentração de glicogênio e a restrição alimentar não teve influência nos animais com 21 dias ao contrário das outras idades. Também

não podemos deixar de levar em consideração que o leite materno, que é o principal alimento desses animais nessa idade, possui menos carboidrato e a ingestão ocorre por um estímulo diferente da mastigação.

Em humanos o ritmo circadiano é responsável por alterações do fluxo salivar independente do estímulo, havendo um aumento do volume de saliva secretada principalmente nos momentos de atividade e que antecedem a alimentação (DAWES, 1972). Nas figuras 2 e 4, comparamos os valores dos conteúdos de glicogênio na PA dos 3 grupos com e sem restrição de alimento e podemos observar que em todos os grupos existiu uma tendência da concentração do glicogênio ficar ao final do dia próximo dos menores valores, indicando uma possível mobilização do glicogênio para secreção de saliva no início das atividades durante a noite, já que os ratos possuem hábitos noturno. Comportamento semelhante é relatado na literatura pela glicemia em humanos, onde se observa um aumento antes dos horários de maior atividade como no período da manhã ao acordar (CAILOTTO et al., 2008; LA FLEUR, 2003).

Os resultados obtidos com as SM mostram a diferença de comportamento do metabolismo de carboidrato e obtenção de energia dessa glândula em relação as PA. O metabolismo de energia entre as duas é diferente, sendo as PA predominantemente aeróbia e as SM anaeróbia, em decorrência dessa característica as PA tendem a mobilizarem menos glicogênio que as SM (NICOLAU; SASSAKI, 1976).

Em nosso estudo podemos verificar que as características de secreção de cada uma das glândulas ficaram bem evidentes. A SM mostra uma degradação do glicogênio constante e gradual durante todo o dia, independente da restrição de alimento, provavelmente pelo fato de contribuir com a secreção da saliva não

estimulada que se dá em volumes menores e constantemente. Nos animais com restrição de alimento, como eles não tiveram estímulo salivar, pois estavam sem alimento a disposição, ficou mais evidente a gradual e contínua degradação do glicogênio durante o dia para suprir a energia necessária para o processo de secreção da saliva não estimulada.

No grupo com livre acesso ao alimento os resultados mostram a degradação do glicogênio, porém seguido de aumentos da concentração dessa molécula, o que pode ser explicado pelo livre acesso ao alimento e a provável alimentação durante o dia, sendo assim, há uma maior mobilização do glicogênio durante a alimentação para a secreção de saliva e depois ocorre a sintetização e o armazenamento de glicogênio devido a ingestão dos carboidratos (NICOLAU; SASSAKI, 1983). Nas glândulas submandibulares a diferença de idade e alimentação não foi evidente como ocorreu na parótida, já que com 21 dias a glândula submandibular já chegou a fase adulta não ocorrendo a diferença da fase de desenvolvimento entre as idades como ocorre na PA.

Semelhante ao ocorrido nas PA também foram obtidos valores da concentração de glicogênio menores ao final do dia independente da restrição ou não de alimento, o que pode indicar a influência do ritmo circadiano nessas glândulas.

No início do estudo os animais não tinham restrição de alimento e o objetivo era analisar a oscilação da concentração de glicogênio durante o dia em animais normais pressupondo que os ratos se alimentassem durante a noite pois são animais de hábitos noturnos (SUCKOW; WEISBROTH; FAKLIN, 2006). Porém os resultados encontrados revelaram uma grande variação da concentração de

glicogênio, principalmente nos animais sem restrição de alimento, sugerindo que a mobilização e síntese de glicogênio deve ter ocorrido devido a alimentação. Com base nestes dados foi proposto um grupo com restrição de alimento no período do dia, das 7 as 19 horas, e os resultados mostraram que houve diferença com o grupo anterior, sugerindo que os animais se alimentavam também durante o dia.

O ritmo circadiano está presente em todos os mamíferos e altera a concentração de diversas substâncias em nosso corpo de acordo com a hora do dia. A secreção salivar é bastante alterada durante as 24 horas do dia, fazendo com que estudos com saliva seja estabelecido um horário fixo de coleta para que os resultados obtidos não sejam influenciados pelo ritmo circadiano. Como já vimos alguns importantes componentes do metabolismo de carboidrato sofrem influencia do ritmo circadiano, como a glicose, o glucagon e a insulina (CAILOTTO et al., 2008; FROY, 2007; LA FLEUR et al., 1999; LA FLEUR, 2003; RUITER et al., 2003) podemos extrapolar que o glicogênio em glândulas salivares pode sofrer influencia do ritmo circadiano. Como nesse estudo analisamos somente 12 horas de um dia não temos como afirmar a sua interferência nesse processo sendo necessário mais estudos para comprovação desse fato, porém com os resultados obtidos podemos observar alguns dados que podem ter sido influenciado pelo ritmo circadiano. Nos animais com restrição de alimento durante o dia foi possível verificar que há diferença de concentração do glicogênio dependendo da hora do sacrifício em todas as idades estudadas. Nas PA de ratos com 21 dias há uma diferença significativa entre o horário das 15 horas como das 17 e 19 horas. Nos animais com 30 dias os resultados obtidos as 7 e 9 horas foram diferentes do resto do dia, e os horários das 11, 13, e 15 horas também foram diferente entre os últimos horários, das 17 e 19

horas. Nos animais com 60 dias também houve uma pequena variação, sendo diferente entre eles o horário das 9 com o das 13 horas.

6.2 Experimentos com ratos diabéticos

O diabetes se caracteriza pelo aumento da glicemia e, quando se torna crônica causa diversas desordens metabólicas em nosso organismo. Um dos principais sintomas causados por essas desordens são a poliúria, polidipsia e apesar da polifagia ocorre a perda de peso (KUZUYA et al., 2002) que em nosso estudo também ocorreu. Essa perda de peso que ocorre apesar da maior ingestão de carboidratos, se deve a menor captação de glicose para o interior das células devido a deficiência no seu transporte, causando uma redução de peso corporal e em outros tecidos (ANDERSON, 1983; ANDERSON et al., 1993; MAHAY et al., 2004).

A xerostomia é um dos principais sintomas relatados por pacientes diabéticos (GONZALEZ-GUEVARA; LINARES-VIEYRA; RODRIGUEZ-DE MENDOZA, 2008; LAMSTER et al., 2008). Em ratos diabéticos parece haver uma hipofunção das glândulas salivares também está presente nas glândulas, pois foi encontrado uma diminuição da concentração da amilase na saliva desses animais, o que indicaria uma menor função das PA, já que a amilase pode ser usada como marcadora da saliva secretada por ela (NEWRICK et al., 1991).

Em nosso estudo os resultados obtidos em PA de ratos diabéticos corroboram com os dados obtidos em outros estudos que mostram um grande acúmulo de glicogênio em PA em relação aos animais normais (NICOLAU et al., 2005), assim nos rins (KANG et al., 1982), pâncreas (MALAISSE et al., 2001), fígado (MATYKA et al., 2001), e retina (HORI; NISHIDA; MUKAI, 1980). Apesar desse grande aumento de glicogênio em PA houve uma menor variação de suas concentrações durante as horas do dia, não indicando um processo de síntese e degradação dessa molécula que deveria ocorrer, pois os animais diabéticos por se alimentarem mais que os normais promovem um maior estímulo do fluxo salivar.

Esses dados sugerem que a síntese de glicogênio está ocorrendo, porém o processo de degradação parece estar deficiente levando o processo de obtenção de energia para outra via, provavelmente a glicogenogênese. Essa via deve estar sendo utilizada pelo fato da hexoquinase ter maior atividade em PA de diabéticos disponibilizando desta forma a G-6P (NOGUEIRA; SANTOS; NICOLAU, 2005) molécula precursora para a síntese de glicogênio, levando ao seu acúmulo.

Nas submandibulares a insulina interfere na síntese de proteínas e na ausência pode causar uma deficiência nesse processo (ANDERSON, 1988), o que nos indica alterações no processo de secreção em indivíduos diabéticos. Em SM de ratos diabéticos quando submetidos a um jejum de 12 horas previamente ao sacrifício foi observado um acúmulo de glicogênio nesses tecidos, porém mais discreto que nas PA (NICOLAU et al., 2005). Em nosso estudo os animais tiveram livre acesso ao alimento e o resultado que encontramos em SM de ratos diabéticos foi uma redução do conteúdo de glicogênio em relação aos animais normais, e semelhante ao que ocorreu nas PA a variação ao longo do dia quase não existiu. A diminuição da concentração de glicogênio em SM de ratos diabéticos pode estar

ocorrendo talvez porque ela não foi tão afetada pelo estado diabético quanto a PA, por isso ela ainda consegue degradar o glicogênio para secreção e pelo fato do diabético mastigar mais devido a polifagia a concentração dessa molécula se mantêm em níveis mais baixos que os ratos normais.

Nos animais diabéticos a variação da concentração de glicogênio ao longo do dia, principalmente em PA, quase não ocorreu o que pode ser um indicativo de que o ritmo circadiano esteja alterado, concordando com outros estudos que mostram alterações no ritmo circadiano pelo estado diabético (YOUNG et al., 2002)

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos é possível concluir que:

- Ocorre uma variação na concentração de glicogênio nas glândulas salivares de ratos normais, quando estudadas ao longo do dia, influenciada provavelmente pelo ritmo circadiano;
- A restrição alimentar imposta aos animais normais influenciou na variação da concentração de glicogênio nas glândulas salivares estudadas;
- Somente nas glândulas PA dos animais com 21 dias de vida há um padrão de variação da concentração do glicogênio diferente dos demais grupos;
- O estado diabético levou a um aumento no conteúdo de glicogênio das glândulas PA e uma redução nas glândulas SM;
- Não há variação no conteúdo de glicogênio ao longo do dia nas glândulas salivares estudadas nos animais diabéticos.

REFERÊNCIAS¹

Amerongen AV, Veerman EC. Saliva-the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002;8(1):12-22.

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

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

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

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

Anderson LC, Johnson DA. Effect of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. *Comp Biochem Physiol* 1981;B 70B:725-30.

Banoczy J, Albrecht M, Rigo O, Ember G, Ritlop B. Salivary secretion rate, pH, lactobacilli and yeast counts in diabetic women. *Acta Diabetol Lat* 1987;24(3):223-8.

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

Ben-Aryeh H, Cohen M, Kanter Y, Szargel R, Laufer D. Salivary composition in diabetic patients. *J Diabet Complications* 1988;2(2):96-9.

Berra B, Rizzo AM. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. *Clin Dermatol* 2009;27(2):202-9.

Brownlee M. Lilly Lecture 1993 - Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994;43(6):836-41.

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

Cailotto C, van Heijningen C, van der Vliet J, van der Plasse G, Habold C, Kalsbeek A, et al.. Daily rhythms in metabolic liver enzymes and plasma glucose require a balance in the autonomic output to the liver. *Endocrinology* 2008;149(4):1914-25.

Carda C, Mosquera-Lloreda N, Salom L, Gomez de Ferraris ME, Peydro A. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11(4):E309-14.

Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(3):305-11.

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

Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972;220(3):529-45.

Dawes C. Rhythms in salivary flow rate and composition. *Int J Chronobiol* 1974;2(3):253-79.

Dawes C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *J Physiol* 1975;244(2):535-48.

Devlin TM. *Manual de bioquímica e correlações clínicas*. 4ª. Ed. São Paulo: Editora Edgarg Blucher Ltda; 1998.

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

Fava-de-Moraes F, Nicolau J. Glycogen concentration in isoproterenol-stimulated salivary glands of mice. *Experientia* 1975;31(9):1010-1.

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.

Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol* 2007;28(2-3):61-71.

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

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

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

Gonzalez-Guevara MB, Linares-Vieyra C, Rodriguez-de Mendoza LE. Prevalence of buccal lesions on type 2 diabetes mellitus. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2008;46(3):237-45.

Harrison R, Bowen WH. Flow rate and organic constituents of whole saliva in insulin-dependent diabetic children and adolescents. *Pediatr Dent* 1987;9(4):287-91.

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

Hwang JH, Perseghin G, Rothman DL, Cline GW, Magnusson I, Petersen KF, et al.. Impaired net hepatic glycogen synthesis in insulin-dependent diabetic subjects during mixed meal ingestion. A ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Invest* 1995;95(2):783-7.

Junqueira LC, Fava-De-Moraes F, Toledo MS. Action of vasopressin on salivary secretion. *Acta Physiol Lat Am* 1967;17(1):36-41.

Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci* 1997;60(9):667-79.

Kang SS, Fears R, Noirot S, Mbanya JN, Yudkin J. Changes in metabolism of rat kidney and liver caused by experimental diabetes and by dietary sucrose. *Diabetologia* 1982;22(4):285-8.

Kariyawasam AP; Dawes C. A circannual rhythm in unstimulated salivary flow rate when the ambient temperature varies by only about 2 degrees C. *Arch Oral Biol* 2005;50(10):919-22.

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

Kjellman O. Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus. *Odontol Revy* 1970;21(2):159-68.

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

La Fleur SE. Daily rhythms in glucose metabolism: suprachiasmatic nucleus output to peripheral tissue. *J Neuroendocrinol* 2003;15(3):315-22.

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 1999;11(8):643-52.

Lamey PJ, Darwazeh AM, Frier BM. Oral disorders associated with diabetes mellitus. *Diabet Med* 1992;9(5):410-6.

Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:19S-24S.

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51(2): 216-26.

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

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

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

Marder MZ, Abelson DC, Mandel ID. Salivary alterations in diabetes mellitus. *J Periodontol* 1975;46(9):567-9.

Masharani U, Rushakoff RJ. Update on systemic management of diabetes. *Int Ophthalmol Clin* 2009;49(2):13-33.

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

Matyka K, Dixon RM, Mohn A, Rajagopalan B, Shmueli E, Styles P, et al.. Daytime liver glycogen accumulation, measured by ¹³C magnetic resonance spectroscopy, in young children with Type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2001;18(8):659-62.

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.

Mills JN. Human circadian rhythms. *Physiol Rev* 1966;46(1):128-71.

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

Narhi TO, Meurman JH, Odont D, Ainamo A, Tilvis R. Oral health in the elderly with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Spec Care Dentist* 1996;16(3):116-22.

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

Reznick AZ, Shehadeh N, Shafir Y, Nagler RM. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2006;51(8):640-8.

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

Rosignol B, Herman G, Chambaut AM, Keryer G. The calcium ionophore A 23 187 as a probe for studying the role of Ca²⁺ ions in the mediation of carbachol effects on rat salivary glands: protein secretion and metabolism of phospholipids and glycogen. *FEBS Lett* 1974;43(2):241-6.

Ruiter M, La Fleur SE, van Heijningen C, van der Vliet J, Kalsbeek A, Buijs RM. The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes* 2003;52(7):1709-15.

Sack RL. The pathophysiology of jet lag. *Travel Med Infect Dis* 2009;7(2):102-10.

Schramm M, Ben-Zvi R, Bdolah A. Epinephrin-Activated Amylase Secretion in Parotid Slices and Leakage of the Enzyme in the Cold. *Biochem Biophys Res Commun* 1965;18:446-51.

Sharon A, Ben-Aryeh H, Itzhak B, Yoram K, Szargel R, Gutman D. Salivary composition in diabetic patients. *J Oral Med* 1985;40(1):23-6.

Ship JA. Diabetes and oral health: an overview. *J Am Dent Assoc* 2003;134 Spec No: 4S-10S.

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.

Sivakumar S, Mirels L, Miranda AJ, Hand AR. Secretory protein expression patterns during rat parotid gland development. *Anat Rec* 1998;252(3):485-97.

Skene DJ, Lockley SW, Arendt J. Use of melatonin in the treatment of phase shift and sleep disorders. *Adv Exp Med Biol* 1999;467:79-84.

Skene DJ, Lockley SW, Thapan K, Arendt J. Effects of light on human circadian rhythms. *Reprod Nutr Dev* 1999;39(3):295-304.

Speirs RL. "The effects of interactions between gustatory stimulation the reflex flow-rate of human parotid saliva." *Arch Oral Biol* 1971;16(4):349-65.

Sreebny LM, Schwartz SS. A reference guide to drugs and dry mouth--2nd edition. *Gerodontology* 1997;14(1):33-47.

Sreebny LM, Valdini A, Yu A. Xerostomia. Part II: Relationship to nonoral symptoms, drugs, and diseases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68(4):419-27.

Sreebny LM, Yu A, Green A, Valdini A. Xerostomia in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1992;15(7):900-4.

Suckow M, Weisbroth SH, Faklin CL. *The laboratory rat*. 2^a Ed. Unated State of America: Elsevier Academic Press; 2006.

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

Thorstensson H, Falk H, Hugoson A, Olsson J. Some salivary factors in insulin-dependent diabetics. *Acta Odontol Scand* 1989;47(3):175-83.

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.

Young ME, Wilson CR, Razeghi P, Guthrie PH, Taegtmeyer H. Alterations of the circadian clock in the heart by streptozotocin-induced diabetes. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(2):223-31.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO nº 14/2007

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, APROVOU o protocolo de pesquisa “Influência do diabetes na regulação circadiana do metabolismo de glicogênio em glândulas salivares de ratos”, de responsabilidade do pesquisador Jonas Alencar de Matos, sob orientação do Professor Doutor Fernando Neves Nogueira.

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, 17 de março de 2008


Prof. Dr. **CELSO LUIZ CALDEIRA**

PRESIDENTE DA SUBCOMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP