

ANÁLISE QUANTITATIVA DOS ÁCINOS DA GLÂNDULA SALIVAR PARÓTIDA DE RATOS DIABÉTICOS SUPLEMENTADOS COM L-GLUTAMINA E SUBMETIDOS À INSULINOTERAPIA

Juliana Crivoi Fiori (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Lucas Henrique da Costa, Aline Rodrigues Lazarin, Eder Paulo Belato Alves, Vilma Aparecida Ferreira de Godoi, Angela Maria Pereira Alves (Orientadora)
e-mail: angela.01.com@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas e Morfologia

Palavras-chave: parênquima glandular, antioxidante, insulina

Resumo:

Objetivou-se neste estudo analisar a densidade dos ácinos da glândula parótida de ratos diabéticos suplementados com L-glutamina (GLN) e submetidos à insulino-terapia. Vinte e cinco ratos machos foram distribuídos em cinco grupos: Normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-S-TRE) e diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-GLN-TRE). Durante 30 dias, houve suplementação diária com solução salina e/ou L-glutamina 400 mg/Kg (gavagem), e injeção subcutânea de solução salina e/ou Insulina Tresiba® (5 U/kg de MC). Não houve diferença na densidade acinar nos ratos do grupo CCS em relação aos demais grupos ($p > 0,05$). A densidade média dos ácinos no grupo DSS apresentou-se maior que a encontrada nos grupos D-GLN-TRE ($p < 0,01$) e D-S-TRE ($p < 0,05$). Tanto o período experimental como a idade dos ratos podem ser fatores que influenciam a capacidade regenerativa da parótida frente a injúrias do DM.

Introdução

Além da contribuição relevante dos antioxidantes que previnem e/ou reduzem as complicações geradas pelo estresse oxidativo oriundo do diabetes mellitus (DM); a insulina é a substância mais eficaz na terapêutica em diabetes, uma vez que esta patologia é uma das principais síndromes de evolução crônica caracterizada por deficiência absoluta ou relativa de insulina que interfere negativamente no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e, que durante sua evolução, dependendo do controle metabólico, podem advir complicações agudas e crônicas, tais como hiperglicemia, glicosúria, complicações vasculares e neuropáticas. As glândulas salivares também são afetadas adversamente (MOREIRA et. Al., 2014), o que predispõe a cavidade oral à uma série de alterações patológicas como xerostomia, periodontite e maior propensão a infecções, entre outras.

Considerando que o controle glicêmico isoladamente, nem sempre é suficiente para abarcar as diversas complicações do diabetes, é imprescindível estudar antioxidantes que possam proteger as células dos radicais livres. A L-glutamina é um aminoácido condicionalmente essencial que participa de vários processos metabólicos importantes para o organismo e serve de substrato para a formação da glutatona, um potente antioxidante endógeno. Além disso, frente às necessidades impostas para o tratamento desta patologia; novos produtos com insulina basal que contam com farmacodinâmica aprimorada e que tem ação biológica prolongada e consistente, com reduzido risco de hipoglicemia e horários de dosagem mais flexíveis, estão sendo desenvolvidos para contornar esses problemas, cuja finalidade é a melhora do controle glicêmico a longo prazo (VORA, et al., 2015). A insulina Tresiba[®] é uma nova geração de análogos de insulina basal, que tem a mesma sequência de aminoácidos que a insulina humana, mas com pequenas modificações em sua composição química. Assim, a dosagem diária deste análogo insulínico resulta em picos baixos que diminuem a variabilidade intra-individual e as concentrações plasmáticas que se tornam menos criticamente dependentes do tempo das injeções. Frente o exposto, objetivou-se neste estudo analisar a densidade dos ácinos da glândula parótida de ratos diabéticos suplementados com L-glutamina e submetidos à insulino terapia.

Materiais e métodos

Utilizou-se 25 ratos machos Wistar com 50 dias de idade (Nº de protocolo de aprovação CEUA: 9584021115), que foram distribuídos em 5 grupos: Normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético e com injeção subcutânea de insulina Tresiba[®] (D-S-TRE) e diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina Tresiba[®] (D-GLN-TRE). Durante 30 dias, houve suplementação diária com solução salina 0,9% e/ou L-glutamina 400 mg/Kg (gavagem), e/ou injeção subcutânea de solução salina ou Insulina Tresiba[®] (5 U/kg de massa corporal).

Após 30 dias de experimento, os animais foram pesados, anestesiados com tiopental (40 mg/kg) intraperitoneal e sacrificados. As parótidas extraídas foram lavadas em solução salina 0,9%, e transferidas para solução fixadora contendo formol tamponado 10%. Cortes histológicos (6µm) foram corados em Hematoxilina-Eosina.

As imagens foram capturadas por câmera de alta resolução acoplada ao microscópio Olympus BX20, em um aumento de 20X, e transmitidas para microcomputador e gravadas em compact disc. Das imagens capturadas, foram quantificados, pelo programa de análise de imagens *Image-Pro-Plus*, os ácinos de 20 campos por animal de cada grupo, a fim de delinear a densidade de ácinos. Os dados coletados foram submetidos a testes estatísticos apropriados, como análise de variância e teste de Tukey para comparação dos aspectos quantitativos dos ácinos glandulares entre os grupos. O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

A análise quantitativa dos ácinos glandulares (Figura 1) demonstrou não haver diferença na densidade acinar nos ratos do grupo controle (CSS) quando comparados aos demais grupos ($p > 0.05$). Observou-se que a densidade média dos ácinos no grupo diabético (DSS) apresentou-se maior que a encontrada nos grupos D-GLN-TRE ($p < 0,001$) e D-S-TRE ($p < 0,05$), aproximando-se assim estes últimos com a densidade média encontrada no grupo controle (CSS).

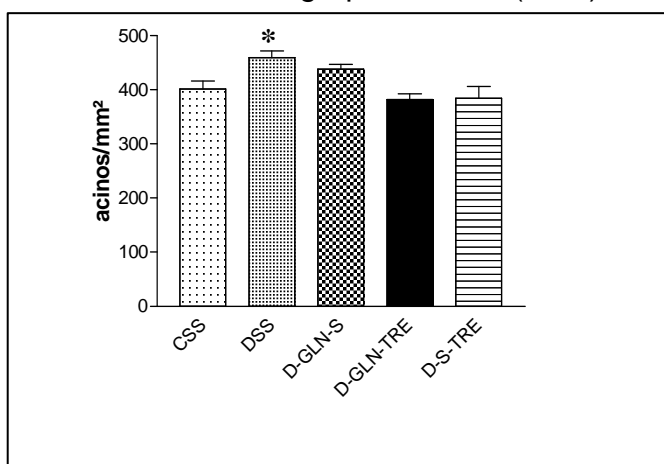


Figura 1 - Densidade acinar média da glândula salivar parótida dos ratos nos grupos: Normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-S-TRE) e diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-GLN-TRE). n=5.

* $p < 0,001$ e $p < 0,05$ quando comparado respectivamente com os grupos D-GLN-TRE e D-S-TRE

A perda numérica de ácinos das glândulas salivares de animais com diabetes crônico é bem documentada na literatura; sobretudo na glândula parótida. Essa perda é justificada por vários fatores, tais como: associação entre o estado hiperglicêmico e aumento do estresse oxidativo com concomitante redução na capacidade antioxidante; auto-oxidação da glicose, glicosilação protéica, peroxidação lipídica e formação de produtos de glicosilação avançadas (AGEs) que induzem as células acinares a sofrerem intensa ação das espécies radiculares, reduzindo a sua capacidade de neutralizá-las e eliminá-las; o que pode gerar morte celular por necrose ou apoptose. Outra condição observada, é o aumento da infiltração de linfócitos no parênquima glandular, que em virtude do processo inflamatório gerado, incorre em destruição tecidual (MOREIRA et al., 2014). Contudo, neste modelo experimental de diabetes com duração de 30 dias, e com ratos com 50 dias de idade, não foi possível observar perda acinar em nenhum dos grupos diabéticos tratados ou não, quando comparados ao grupo normoglicêmico (CSS); porém, esses dados contrastam com os resultados obtidos a partir de modelo experimental de diabetes crônico com duração de 120 dias realizado em experimentos anteriores no nosso laboratório e em outros estudos compilados na literatura. Isto pode ser sugestivo de que neste período de tempo e nessa faixa etária, o parênquima da glândula salivar parótida recorra à plasticidade parenquimal a fim de se regenerar de injúrias ocasionadas pelos efeitos deletérios do DM. Este achado corrobora o estudo de Man et al., (2001) ao constatar que as células dos ductos intercalares de glândulas submandibulares exibem relevante papel na renovação celular, tendo a possibilidade de sofrerem diferenciação em bloco para

substituir os ácinos; além de contribuírem para a deposição adicional de células individuais nos limites entre os ductos intercalares com os ácinos e com os ductos estriados. Fossati et al., (2004) acrescentam ainda que o desenvolvimento de todas as glândulas salivares é semelhante e que há um segmento ductal entre os ductos intercalares e estriados que secretam fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), entre outros, que influenciam na regeneração da glândula submandibular, e possivelmente nas demais glândulas salivares.

A análise da densidade média dos ácinos no grupo diabético (DSS) mostrou-se significativamente maior que a encontrada nos grupos D-GLN-TRE e D-S-TRE. Considerando que a área do campo analisada foi de 5,552 mm² para todas as imagens de cada grupo, e observando os dados da análise morfológica que evidenciaram maior área acinar média, justamente nos grupos D-GLN-TRE e D-S-TRE, enquanto os ácinos do grupo DSS mostraram-se menores (dados não apresentados); nos permite inferir que, como a área analisada das imagens é a mesma para todos os grupos, e a área dos ácinos do grupo DSS foram menores, poderiam ser visualizados em maior número ocupando a mesma área.

Conclusões

A partir dos dados obtidos, podemos inferir que tanto o período experimental como a idade dos ratos podem ser fatores que aumentam ou diminuem a capacidade regenerativa da glândula parótida frente a injúrias causadas pelo DM.

Agradecimentos

Agradecemos ao PIBIC-Af-IS/CNPq-Fundação Araucária-UEM

Referências

FOSSATI, A.C.M.; SALGADO, F.L.; GAIO, E.J.; BENDER, A.S. Estudo da morfo e citodiferenciação da glândula submandibular remanescente de ratos após excisão parcial de um de seus lobos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 70, 3: 323-329, 2004.

MAN, Y.G.; BALL, W.D.; MARCHETTI, L.; HAND, A.R. Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. **The Anatomical Record** 1; 263 (2): 202-14, 2001.

MOREIRA, C.R.; FERRARI, F.; ALVES, E.P.B.; BIN, L.R.; MACHADO, J.S.; DALZOTTO, E.; ALVES, A.M.P. Infiltração linfocítica no parênquima da glândula salivar parótida de ratos diabéticos suplementados com acetil-l-carnitina. **Revista Saúde e Pesquisa**. 7(1): 83-90, 2014.

VORA, J.; CARIOU, B.; EVANS, M.; GROSS, J.L.; HARRIS, S.; LANDSTEDT-HALLIN, L.; MITHAL, A.; RODRIGUEZ, M.R.; MENEGHINI, L. Clinical use of insulin degludec. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 109:1, pp.19-31, 2015.