

## **EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM L-GLUTAMINA (GLN) SOBRE OS ÁCINOS SEROSOS DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE RATOS DIABÉTICOS TIPO 1 SUBMETIDOS À INSULINOTERAPIA: ANÁLISE QUANTITATIVA**

Anderson Jorge de Oliveira da Rocha (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Yasmin Morais Zanin, Alberto José Pelegrini, Vilma Aparecida Ferreira de Godoi, Angela Maria Pereira Alves, Eder Paulo Belato Alves (Orientador), e-mail: epbalves@uem.br

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

**Área e sub-área do conhecimento: Morfologia**

**Palavras-chave:** glândula salivar, antioxidante, insulinoterapia.

### **Resumo:**

Objetivou-se neste estudo, averiguar os efeitos da suplementação com L-glutamina (GLN) sobre os ácinos serosos da glândula submandibular de ratos diabéticos tipo 1 submetidos à insulinoterapia, através de análise quantitativa. Para tal, vinte e cinco ratos foram distribuídos em cinco grupos (n=5): 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 ou L-glutamina 400 mg/Kg (gavagem), e/ou injeção subcutânea de solução salina ou Insulina Tresiba® (5 U/kg de massa corporal). Para a análise quantitativa, foram quantificadas as imagens dos ácinos serosos de 20 campos por animal de cada grupo. Houve aumento significativo da densidade acinar nos ratos do grupo DSS em relação aos do grupo CSS; assim como, quando os grupos diabéticos D-GLN-S, D-S-TRE e D-GLN-TRE foram comparados aos do grupo DSS. Também houve aumento significativo da densidade acinar média nos grupos diabéticos tratados D-GLN-S, D-S-TRE e D-GLN-TRE em relação aos do grupo CSS. A ação isolada e/ou combinada da glutamina com a insulina Tresiba® melhorou os parâmetros de densidade acinar, embora não tenha equiparando-se aos do grupo CSS. Outro aspecto a ser considerado é que tanto o período experimental como a idade dos ratos podem ser fatores que influenciam a capacidade regenerativa da submandibular frente aos danos do diabetes mellitus (DM).

### **Introdução**

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), é descrito como uma doença autoimune, em que células  $\beta$ -pancreáticas são atacadas por linfócitos T, resultando em uma baixa produção de insulina ou mesmo a sua ausência. Por este motivo, a sua reposição diária é obrigatória, sendo um meio de prevenir a hiperglicemia. Muitos tipos de

insulina estão disponíveis no mercado e vão diferir principalmente quanto ao tempo de ação biológica. Tresiba® é um análogo da insulina basal, de ação ultra prolongada e consistente, tendo menor risco de variabilidade glicêmica e dosagens mais flexíveis, que pode melhorar o controle glicêmico a longo prazo (TAMBASCIA; ELIASCHEWITZ, 2015). O estresse oxidativo desencadeado pela DM repercute em alterações morfofuncionais dos ácinos das glândulas salivares, observadas na forma de atrofia e perda numérica. Com o objetivo de reduzir esses efeitos; terapias alternativas como a L-Glutamina (GLN) vem demonstrando resultados promissores, no que tange os processos fisiológicos, tais como atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e imunomoduladoras. Deste modo, objetivou-se neste estudo, averiguar os efeitos da suplementação com L-glutamina (GLN) sobre os ácinos serosos da glândula submandibular de ratos diabéticos tipo 1 submetidos à insulino terapia, através de análise quantitativa.

## Materiais e Métodos

Utilizou-se 25 ratos 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

Na análise quantitativa dos ácinos serosos da glândula submandibular foi constatado aumento significativo da densidade acinar nos ratos do grupo DSS ( $25,12 \pm 0,38$ ) em relação aos do grupo CSS ( $19,58 \pm 0,40$ ) assim como, quando os grupos diabéticos D-GLN-S ( $22,44 \pm 0,09$ ), D-S-TRE ( $22,1 \pm 0,85$ ) e D-GLN-TRE ( $21,7 \pm 0,40$ ) foram comparados aos do grupo DSS. Também houve aumento significativo da densidade

acinar média nos grupos diabéticos tratados D-GLN-S, D-S-TRE e D-GLN-TRE em relação aos do grupo CSS (Figura 1).

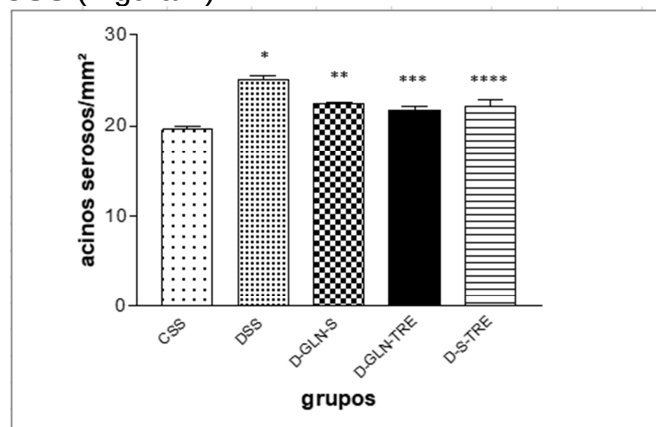


Figura 1 – Densidade acinar média da glândula salivar sumandibular dos ratos nos grupos: Normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-GLN-TRE) e diabético e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-S-TRE). \*  $p < 0,001$  comparado com grupo CSS; \*\*  $p < 0,01$  comparado com grupo CSS; \*\*\*  $p < 0,05$  comparado com grupo CSS; \*\*\*\*  $p < 0,05$  comparado com grupo CSS.

A redução na densidade dos ácinos serosos das glândulas salivares parótida e submandibular de animais com diabetes crônico é bem descrita em estudos clínicos e experimentais. Alguns fatores são aventados para tentar justificar essa perda numérica, tais como: relação entre o estado hiperglicêmico e aumento do estresse oxidativo com concomitante redução na capacidade antioxidante; auto oxidação da glicose, glicosilação proteica, peroxidação lipídica e formação de produtos de glicosilação avançadas (AGEs) que induzem as células acinares a sofrerem intensa ação das espécies radicalares, reduzindo a sua capacidade de neutralizá-las e eliminá-las; e culminar em morte celular por necrose ou apoptose. Outra condição observada, é o aumento da infiltração linfocítica no parênquima glandular, que em virtude do processo inflamatório gerado, incorre em destruição tecidual (MOREIRA et al., 2014). Neste modelo experimental de diabetes com duração de 30 dias, e com ratos com 50 dias de idade, não foi possível observar redução da densidade 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 submandibular ative sua plasticidade parenquimal a fim de se regenerar de injúrias ocasionadas pelos efeitos prejudiciais do DM. Este resultado corrobora o estudo de Man et al., (2001) ao constatar que as células dos ductos intercalares de glândulas submandibulares possuem um papel crucial nos processos de renovação celular, possibilitando a 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) apensam ainda que o desenvolvimento de todas as glândulas salivares é análogo, e que o segmento ductal existente entre os ductos intercalares e estriados secretam fatores de crescimento como o fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), entre outros, que influem na regeneração tecidual da glândula submandibular.

A análise da densidade média dos ácinos nos grupos D-S-GLN, D-S-TRE, D-GLN-TRE, mostrou-se significativamente menor que a encontrada no grupo diabético (DSS), assim como na comparação deste grupo diabético com o do grupo normoglicêmico (CSS). Considerando que a área do campo analisada foi de 5,552 mm<sup>2</sup> para todas as imagens de cada grupo, e observando os dados da análise morfométrica que evidenciaram maior área acinar média, justamente nos grupos D-GLN-TRE e CSS, enquanto os ácinos do grupo DSS mostraram-se muito 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

Os dados obtidos denotam que a ação isolada e/ou combinada da glutamina com a insulina Tresiba® melhorou os parâmetros de densidade acinar, embora não tenha equiparado-se aos do grupo CSS. Outro aspecto a ser considerado é que tanto o período experimental como a idade dos ratos podem ser fatores que influenciam a capacidade regenerativa da glândula submandibular frente às alterações causadas pela condição hiperglicêmica.

## Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM e à Fundação Araucária.

## 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. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** 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. **Anat Rec.** 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.

TAMBASCIA, M.A.; ELIASCHEWITZ, F.G. Degludec: the new ultra-long insulin analogue. Diabetology & Metabolic Syndrome. 7, p.57, 2015.