

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DAS TERMINAÇÕES SECRETORAS MUCOSAS DA GLÂNDULA SALIVAR SUBMANDIBULAR DE RATOS DIABÉTICOS SUPLEMENTADOS COM L-GLUTAMINA E SUBMETIDOS À INSULINOTERAPIA

Alberto José Pelegrini (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Yasmin Morais Zanin, Anderson Jorge de Oliveira da Rocha, Marli Aparecida Defani, Eder Paulo Belato Alves, Angela Maria Pereira Alves (Orientadora), e-mail: ampereira@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 avaliar a morfometria das terminações secretoras mucosas da glândula salivar submandibular de ratos diabéticos suplementados com L-glutamina (GLN) e submetidos à insulinoterapia. 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 Lglutamina 400 mg/Kg (gavagem), e/ou injeção subcutânea de solução salina ou Insulina Tresiba® (5 U/kg de massa corporal). Para a análise morfométrica, foi mensurada a área (μm^2) de 100 terminações secretoras por animal, perfazendo o total de 500 terminações secretoras em cada grupo estudado; expressando-se os resultados em área média de terminação secretora por grupo. Os grupos DSS, D-GLN-S e D-S-TRE mostraram menor área média de terminação secretora em relação ao grupo CSS ($p < 0,001$). A área média das terminações secretoras mucosas do grupo D-GLN-TRE evidenciou maior área média ($p < 0,001$) em relação à dos ratos do grupo DSS, bem como equiparou-se à do grupo CSS ($p > 0,05$). Estes dados apontam para o efeito protetor da L-glutamina combinada com a insulina Tresiba® ao prevenir a atrofia das terminações secretoras mucosas da glândula submandibular de ratos diabéticos.

Introdução

As glândulas salivares são responsáveis pela produção da saliva que é crucial para a digestão e manutenção da saúde bucal. Contudo, as mesmas são afetadas pelos efeitos deletérios do diabetes mellitus (DM) que causa alterações morfológicas, estruturais e fisiológicas, sendo expressas pela atrofia e redução numérica de ácinos e de outros componentes do parênquima glandular. Estas alterações têm sido associadas ao estresse oxidativo que é elevado no quadro diabético. Substâncias com propriedades antioxidantes como a L-Glutamina (GLN) tem demonstrado efeitos

benéficos para reduzir o desequilíbrio oxidativo em vários órgãos e sistemas. Além disso, frente às necessidades impostas para o tratamento desta patologia; novos produtos com insulina basal estão sendo desenvolvidos e 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 avaliar a morfometria das terminações secretoras mucosas da glândula salivar submandibular de ratos diabéticos suplementados com L-glutamina (GLN) e submetidos à insulino terapia.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 25 ratos adultos, da linhagem Wistar com 50 dias de idade, (CEUA nº 9584021115), e 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 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 eutanasiados. As submandibulares 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. Imagens das terminações secretoras mucosas capturadas por câmera acoplada ao microscópio foram transmitidas para computador. Para a análise morfométrica, foi mensurada a área (µm²) de 100 terminações secretoras por animal, perfazendo o total de 500 terminações secretoras em cada grupo estudado; expressando-se os resultados em área média de terminação secretora por grupo.

Os dados foram submetidos a testes estatísticos apropriados, como análise de variância e teste de Tukey para comparação dos aspectos morfométricos das terminações secretoras glandulares entre os grupos. O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

Houve redução da área média das terminações secretoras mucosas das glândulas submandibulares ($p < 0,001$) nos ratos dos grupos DSS ($3104 \pm 62,91 \mu\text{m}^2$), D-GLN-S ($3186 \pm 74,74 \mu\text{m}^2$) e D-S-TRE ($3179 \pm 73,81 \mu\text{m}^2$) quando comparada a dos ratos do grupo CSS ($3868 \pm 95,66 \mu\text{m}^2$), (Figura 1). Os ratos dos grupos D-GLN-S e D-S-TRE exibiram áreas médias das terminações secretoras similares entre si e com as dos ratos do grupo DSS ($p > 0,05$). No entanto, a área média das terminações secretoras dos ratos do grupo D-GLN-TRE ($3641 \pm 71,57 \mu\text{m}^2$) equiparou-se à do grupo CSS

($p > 0,05$), bem como evidenciou maior área média ($p < 0,001$) em relação à dos ratos do grupo DSS.

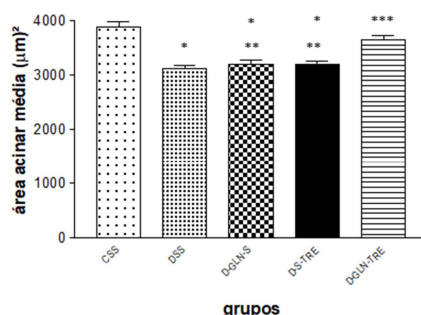


Figura 1 – Área acinar média das terminações secretoras mucosas da glândula submandibular de ratos nos grupos: Normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-S-TRE) e diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-GLN-TRE). * $p < 0,001$ comparado com grupo CSS; ** $p > 0,05$ comparado com grupo DSS; *** $p > 0,05$ comparado com grupo CSS e $p < 0,001$ comparado com grupo DSS.

A morfologia das glândulas salivares e a secreção de saliva que é essencial para a saúde da cavidade oral, podem ser afetadas por certas condições como o envelhecimento e por patologias, tais como a Síndrome de Sjögren e diabetes mellitus (DM). O diabetes afeta de modo seletivo as glândulas salivares maiores (parótidas, sublinguais e submandibulares), tanto que, Knás et al., 2016, constataram redução drástica da densidade média e maior atrofia acinar na glândula parótida em ratos com hiperglicemia crônica, em decorrência do estresse oxidativo. No entanto, esse efeito não tem sido observado na glândula sublingual, em condições experimentais similares (KAMATA et al., 2007). Este tipo de alteração também pode frequentemente incidir sobre a glândula submandibular, e geralmente manifesta-se por deficiências nos processos de manutenção do tecido glandular e na sua renovação celular.

Em nossa pesquisa, a análise morfométrica (Figura 1) indicou atrofia das terminações secretoras da glândula submandibular dos ratos diabéticos dos grupos DSS, D-GLN-S e D-S-TRE quando comparados aos dos ratos do grupo normoglicêmico (CSS). A atrofia acinar da glândula submandibular é bem documentada na literatura, e está relacionada a alterações degenerativas que implicam em danos à arquitetura celular, desequilíbrio eletrolítico, modificações atípicas da célula, pressão osmótica, variações do conteúdo e distribuição de aquaporinas; o que culminaria em xerostomia.

Terapias complementares através de suplementações, com o intuito de prevenir e/ou reduzir as complicações típicas do DM1, são geralmente insuficientes sem o uso de insulina exógena, uma vez que o organismo perde a capacidade de produzir esse hormônio. Essa condição também foi observada em nosso estudo, ao verificar

que a ação combinada entre GLN e insulina Tresiba® no grupo D-GLN-TRE, atenuou a redução da área das terminações secretoras em relação aos demais grupos diabéticos, bem como equiparou-se à morfometria dessas terminações secretoras observadas no grupo CSS ($p>0,05$). Assim, alguns fatos podem ser importantes para elucidar o avanço deste parâmetro, tais como: a GLN aumenta a síntese de glutathione, potencializando as defesas antioxidantes; é o aminoácido mais eficaz para induzir a liberação do peptídeo-1 como glucagon (GLP-1) secretado pelas células enteroendócrinas L gastrointestinais e que tem papel relevante na mediação da liberação fisiológica de insulina após uma refeição (SAMOCHA-BONET, 2015); bem como, o fato de a insulina aumentar os níveis de DNA, RNA, proteína total e enzimas secretoras das glândulas salivares de ratos diabéticos, desempenhando função crucial na regulação do crescimento e morfofisiologia destas glândulas (ANDERSON, 1983).

Conclusões

Os dados obtidos apontam para o efeito protetor da L-glutamina combinada com a insulina Tresiba® ao prevenir a atrofia das terminações secretoras mucosas da glândula submandibular de ratos diabéticos.

Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM e à Fundação Araucária.

Referências

ANDERSON, L.C. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. **Am J Physiol.** 245(3):G431-7,1983.

KAMATA, M.; SHIRAKAWA, M.; KIKUCHI, K.; MATSUOKA, T.; AIYAMA, S. Histological analysis of the sublingual gland in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 84(2):71-6, 2007.

KNÁS, M.; MACIEJCZYK, M.; DANISZEWSKA, I., et al. Oxidative Damage to the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes-Temporal Study: Oxidative Stress and Diabetic Salivary Glands. *J. Diabetes Res.* vol. 2016, 2016.

SAMOCHA-BONET, D.; CHISHOLM, D.J.; HOLST, J.J.; GREENFIELD, J.R. L-glutamine and whole protein restore first-phase insulin response and increase glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes patients. **Nutrients.** 24; 7 (4):2101-8, 2015.

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 Res Clin Pract.* 109:1, pp.19-31, 2015.