



e-ISSN 2446-8118

AÇÃO COMBINADA DA L-GLUTAMINA E INSULINOTERAPIA MELHORA A MORFOMETRIA DOS ÁCINOS DA PARÓTIDA DE RATOS DIABÉTICOS

COMBINED ACTION OF L-GLUTAMINE AND INSULIN THERAPY IMPROVES PAROTID ACINE MORPHOMETRY IN DIABETIC RATS

LA ACCIÓN COMBINADA DE LA TERAPIA CON L-GLUTAMINA E INSULINA MEJORA LA MORFOMETRÍA DEL ACINO PARÓTIDO EN RATAS DIABÉTICAS

46

Angela Maria Pereira Alves¹
Marli Aparecida Defani Aparecida Defani²
Vilma Aparecida Ferreira de Godoi³
Stephanie Carvalho Borges⁴
Éder Paulo Belato Alves⁵

RESUMO: Objetivo: Objetivou-se neste estudo, analisar se a ação combinada da L-glutamina e insulino terapia melhora os parâmetros morfoquantitativos dos ácinos da parótida de ratos diabéticos. **Métodos:** Vinte e cinco ratos 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 por gavagem), e injeção subcutânea de solução salina e/ou Insulina Tresiba® (5 U/kg). **Resultados:** Não houve diferença significativa na densidade acinar dos grupos diabéticos em relação ao grupo controle CSS. Porém, o grupo tratado com apenas com insulina (D-S-TRE) e insulina mais a L-GLN (D-GLN-TRE) mostraram menor densidade acinar quando comparados com o grupo diabético DSS. Todos os grupos diabéticos apresentaram menor área acinar média em relação ao grupo controle CSS. Entre os grupos diabéticos, a área acinar média do grupo D-GLN-TRE foi maior comparada aos grupos DSS, D-GLN-S e D-S-TRE. **Conclusão:** Estes dados apontam para o efeito protetor da L-glutamina combinada com a insulina ao prevenir a densidade e atrofia acinar da glândula parótida de ratos diabéticos.

DESCRITORES: Antioxidante; Insulina; Glândula Salivar.

ABSTRACT

¹ Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela UEM/PR, Universidade Estadual de Maringá, Docente Adjunto da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil.

² Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela UEM/PR, Universidade Estadual de Maringá, Docente Adjunto da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil.

³ Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela UEM/PR, Universidade Estadual de Maringá, Docente Adjunto da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil.

⁴ Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela UEM/PR, Universidade Estadual de Maringá, Docente da Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá (SC), Brasil.

⁵ Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular) pela UEM/PR, Universidade Estadual de Maringá, Docente Adjunto da Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), Brasil.

Objective: The objective of this study was to analyze whether the combined action of L-glutamine and insulin therapy improves the morphoquantitative parameters of parotid acini in diabetic rats.

Methods: Twenty-five rats were divided into five groups: Normoglycemic (CSS); diabetic (DSS); diabetic supplemented with L-GLN (D-GLN-S); diabetic and with subcutaneous injection of insulin Tresiba® (D-S-TRE) and diabetic supplemented with L-GLN and with subcutaneous injection of insulin Tresiba® (D-GLN-TRE). For 30 days, there was daily supplementation with saline and/or L-glutamine (400 mg/kg by gavage), and subcutaneous injection of saline and/or Tresiba® Insulin (5 U/kg). **Results:** There was no significant difference in the acinar density of the diabetic groups compared to the CSS control group. However, the insulin treated group (D-S-TRE) and insulin and L-GLN (D-GLN-TRE) showed lower acinar density when compared with the DSS diabetic group. All diabetic groups had a smaller mean acinar area compared to the CSS control group. Among the diabetic groups, the mean acinar area of the D-GLN-TRE group was higher compared to the DSS, D-GLN-S and D-S-TRE groups. **Conclusion:** These data point to the protective effect of L-glutamine combined with insulin in preventing acinar atrophy of the parotid gland in diabetic rats.

DESCRIPTORS: Antioxidant; Insulin; Salivary Gland.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo de este estudio fue analizar si la acción combinada de la terapia con L-glutamina e insulina mejora los parámetros morfocuantitativos de los acinos parotídeos en ratas diabéticas. **Métodos:** Veinticinco ratas se dividieron en cinco grupos: normoglucémicos (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado con L-GLN (D-GLN-S); diabéticos y con inyección subcutánea de insulina Tresiba® (D-S-TRE) y diabéticos suplementados con L-GLN y con inyección subcutánea de insulina Tresiba® (D-GLN-TRE). Durante 30 días, hubo suplementación diaria con solución salina y/o L-glutamina (400 mg/kg por sonda) e inyección subcutánea de solución salina y/o insulina Tresiba® (5 U/kg). **Resultados:** No hubo diferencia significativa en la densidad acinar de los grupos diabéticos en comparación con el grupo control CSS. Sin embargo, el grupo tratado con insulina (D-S-TRE) e insulina y L-GLN (D-GLN-TRE) mostró menor densidad acinar en comparación con el grupo diabético DSS. Todos los grupos de diabéticos tenían un área acinar media más pequeña en comparación con el grupo de control CSS. Entre los grupos de diabéticos, el área acinar media del grupo D-GLN-TRE fue mayor en comparación con los grupos DSS, D-GLN-S y D-S-TRE. **Conclusión:** Estos datos apuntan al efecto protector de la L-glutamina combinada con insulina en la prevención de la atrofia acinar de la glándula parótida en ratas diabéticas.

DESCRIPTORES: Antioxidante; Insulina; Glándula salival.

INTRODUÇÃO

A hiperglicemia crônica está vinculada ao surgimento de complicações orais que podem restringir a qualidade de vida dos indivíduos diabéticos. Entre as complicações mais notórias estão a xerostomia, doença periodontal, gengivite, predisposição elevada a infecções microbianas, síndrome da boca ardente, língua fissurada e disgeusia.¹ Tais complicações são resultantes de danos na estrutura e na morfofisiologia do parênquima das glândulas salivares que, a exemplo de outros órgão e tecidos, são acometidas pelos efeitos deletérios do Diabetes Mellitus (DM).² Tem sido bem documentado que as glândulas

parótidas são mais suscetíveis a tais efeitos e que estes podem ser constatados pela redução numérica e atrofia acinar,² restrição e/ou alteração no conteúdo e síntese de proteínas,² infiltração linfocítica no parênquima glandular,³ bem como à maior predisposição desta glândula ao estresse oxidativo.⁴

Dentre os efeitos prejudiciais que contribuem para a promoção do avanço das complicações do diabetes no organismo, é a intensificação do estresse oxidativo. Sob esta condição, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) sobrepõe-se à ação da capacidade antioxidante do sistema de defesa próprio das células, causando danos

irreversíveis às mesmas; tais como perda das suas funções e morte por necrose ou apoptose.⁵

Embora o controle glicêmico seja essencial para amenizar os danos causados pelo DM; nem sempre esta condição isoladamente é suficiente para abranger as diversas complicações desta patologia, sendo crucial esmiuçar estudos sobre substâncias que tenham potencial poder antioxidante. Neste aspecto, pesquisas vêm demonstrando que o uso de antioxidantes como os carotenoides,⁶ curcumina, licopeno,⁷ e L-glutamina⁸ produzem efeitos benéficos para reduzir o estresse oxidativo em vários órgãos e sistemas.

A L-glutamina (GLN) é um aminoácido condicionalmente essencial, cuja versatilidade é notada por sua contribuição ativa no metabolismo celular; participando como fonte principal de glutamato para a produção de glutathione, um potente antioxidante endógeno que mantém a homeostase redox das células e atuando como transportador primário de nitrogênio e carbono nos tecidos sendo importante para a síntese proteica.⁹ A literatura ainda versa sobre alguns atributos farmacológicos benéficos da GLN, tais como: hepatoprotetora e cardioprotetora.⁸

Além dos antioxidantes que são coadjuvantes, a insulina é a base terapêutica em diabetes tipo 1, e ainda que esta substância atue de modo eficaz na redução dos níveis glicêmicos, a sua utilização permanece um desafio, pelo fato de tornar-se subutilizada no tratamento do diabetes ou em virtude de dosagem inadaptada que pode incidir em risco significativo de hipoglicemia.¹⁰ Deste modo, frente às necessidades impostas para o tratamento desta patologia, novos análogos de insulina basal que contam com perfil farmacodinâmico sofisticado e com ação biológica prolongada e consistente bem como, risco reduzido de hipoglicemia e horários de dosagem mais flexíveis, estão sendo desenvolvidos para melhorar o controle glicêmico a longo prazo.¹¹ A insulina degludeca (Tresiba[®]) é uma nova geração de análogos de insulina basal, que exibe pequenas modificações em sua composição química quando comparada à insulina humana. Essas modificações permitem que, ao ser injetada no tecido subcutâneo, a mesma se precipite, formando um depósito de multihexameros, dos

quais gradualmente dissociam-se em seus monômeros.¹² Por apresentar tempo de meia-vida de mais de 25 horas, sua dosagem diária resulta em picos reduzidos que diminuem a variabilidade intraindividual e as concentrações plasmáticas que tornam-se essencialmente menos dependentes do tempo das injeções.¹³

Apesar dos benefícios gerados pela insulino terapia em humanos e animais diabéticos que repercutem em melhora na qualidade de vida dos mesmos, uma outra abordagem que ainda merece investigação são os possíveis efeitos protetores da L-glutamina (GLN) sobre o parênquima das glândulas salivares de ratos diabéticos submetidos à insulino terapia. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar se a ação combinada da L-glutamina e insulino terapia melhora os parâmetros morfoquantitativos dos ácinos da glândula parótida de ratos diabéticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 25 ratos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com 50 dias de idade e provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), os quais eram pertencentes a um projeto desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular (PBC) desta Universidade, aprovado no Comitê de ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) com número de parecer 9584021115. Para a execução deste estudo, foi aprovada junto ao CEUA, uma emenda da proposta com o mesmo número de parecer do referido projeto supracitado.

Os ratos foram mantidos em caixas (3/caixa) de polipropileno (40cmx33cmx15cm), no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, em temperatura (23 ± 2 °C) e iluminação (12 h claro, 12 h escuro) controlada, com ração padronizada (Nuvital[®] – Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Os ratos foram suplementados diariamente por 30 dias com solução salina ou L-glutamina (GLN) (400 mg/Kg por via oral por gavagem), e receberam diariamente por 30 dias, injeção subcutânea de solução salina ou Insulina degludeca (5 U/kg de massa corporal). A escolha da dose de 400

mg/kg de GLN (Ajinomoto®) fornecida aos animais foi determinada por comparação com a dose máxima de glutamina dipeptídeo indicada para humanos. A L-glutamina foi adquirida em farmácia de manipulação e a estrepto-zotocina da Sigma®. A insulina degludeca (Tresiba®) foi obtida da Novo Nordisk. Todos os outros reagentes foram obtidos com alto grau de pureza.

Os 25 animais foram distribuídos em 5 grupos experimentais: Grupo CSS: animais não-diabéticos que receberam solução salina (volume 0,1 mL/100 g de massa corporal) por gavagem e injeção subcutânea de solução salina (volume 0,1 mL/100 g de massa corporal); Grupo DSS: animais diabéticos que receberam solução salina (volume 0,1 mL/100 g de massa corporal) por gavagem e injeção subcutânea de solução salina (volume 0,1

mL/100 g de massa corporal); Grupo D-GLN-S: animais diabéticos que receberam 400 mg/kg de massa corporal de GLN por gavagem e injeção subcutânea de solução salina (volume 0,1 mL/100 g de massa corporal); Grupo D-S-TRE: animais diabéticos que receberam solução salina (volume 0,1 mL/100 g de massa corporal) por gavagem e injeção subcutânea de Insulina degludeca (5 U/Kg de massa corporal) e Grupo D-GLN-TRE: animais diabéticos que receberam receberam 400 mg/kg de massa corporal de GLN por gavagem e injeção subcutânea de Insulina degludeca (5 U/Kg de massa corporal) (Tabela 1). Durante todo o período de tratamento foram feitas avaliações semanais da glicemia de jejum e prandial, ingestão alimentar e massa corporal em todos os animais.

Tabela 1 – Grupos experimentais e tratamento.

Grupos		Tratamento	
		GLN*	TRE*
CSS	Normoglicêmico	–	–
DSS	Diabético	–	–
D-GLN-S	Diabético	400 mg/kg	–
D-S-TRE	Diabético	–	5 U/kg
D-GLN-TRE	Diabético	400 mg/kg	5 U/kg

*GLN = L-glutamina; * TRE = Insulina degludeca; OBS = kg de massa corporal

Após um período de aclimação no biotério setorial de Ciências Fisiológicas, os animais foram submetidos a jejum noturno (15 h) e receberam injeção endovenosa (veia peniana) de estrepto-zotocina (55 mg/kg de peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em tampão citrato, pH 4,5 (10 mM). Após 4 dias, a glicemia no estado alimentado e de jejum foi mensurada pela cauda, via glicosímetro/glicofita, e foram considerados diabéticos e incluídos neste estudo, os animais que apresentaram glicemia de jejum e pós-prandial ≥ 300 mg/dL. Os animais não-diabéticos foram submetidos ao mesmo procedimento e receberam tampão citrato, pH 4,5 (10 mM) por injeção endovenosa (veia peniana), em vez de estrepto-zotocina.

Finalizado os 30 dias de tratamento, os ratos foram anestesiados com Tiopental sódico (Thionembutal®) e Lidocaína (40/10 mg/Kg de peso corporal) e a eutanásia ocorreu por sobredose anestésica. Em seguida, foi realizada a excisão na cabeça dos ratos para coleta das

glândulas salivares parótidas. Após a extração, as mesmas foram lavadas em solução salina (NaCl 0,9%) e transferidas para solução de formalina 10% por um período de 12 horas, promovendo a fixação dos tecidos glandulares. Sequencialmente, as mesmas foram lavadas em água corrente para serem armazenados em álcool 70%. Para a realização do processamento histológico, foi utilizada uma série crescente de concentrações de álcoois, e os tecidos foram desidratados, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo com 6µm espessura. Os cortes de cada glândula foram submetidos à coloração em Hematoxilina-Eosina (HE).

Para as análises quantitativa e morfométrica dos ácinos serosos da glândula parótida, as imagens foram capturadas por câmera de alta resolução acoplada ao microscópio Olympus BX40, e transmitidas para microcomputador e gravadas em compact disc. Por meio do programa computadorizado de análise de imagens Image-Pro-Plus, foram

quantificados todos os ácinos visualizados a partir de 20 imagens capturadas por glândula/animal em aumento de 20X, com a finalidade de delinear a densidade de ácinos. O mesmo procedimento foi realizado para a análise morfométrica, onde foi mensurada a área (μm^2) do perfil de 100 ácinos serosos da glândula parótida, por glândula/animal, perfazendo o total de 500 ácinos em cada grupo estudado, expressando-se os resultados em média das áreas dos ácinos por grupo.

As análises foram realizadas no Software GraphPad Prim 7. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de *Tukey*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Os

valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises de massa corporal dos animais (Tabela 2), mostra o Δ , resultado da subtração da massa corporal final com a inicial, indicando que o grupo diabético (DSS) e diabético tratado com GLN (D-GLN-S) apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (CSS). Além disso, é possível verificar que o tratamento com insulina (D-S-TRE) e o tratamento com GLN e insulina (D-GLN-TRE) promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) na massa corporal quando comparado com o grupo diabético (DSS).

Tabela 2 - Massa corporal ao início e final do tratamento (g) e diferença entre a massa corporal ao início e final do tratamento (Δ) (g), após 30 dias de suplementação, para ratos Wistar dos grupos Controle (CSS) e Diabético (DSS) que receberam salina via oral e subcutânea; Diabéticos (D-GLN-S) suplementados com GLN 400 g/kg de peso corporal e injeção de salina subcutânea; Diabéticos (D-S-TRE) que receberam salina oral e injeção de Insulina Tresiba® (5 U/kg) subcutânea; Diabéticos (D-GLN-TRE) suplementados com GLN 400 g/kg de peso corporal e injeção de Insulina Tresiba® (5 U/kg) subcutânea.

	CSS	DSS	D-GLN-S	D-S-TRE	D-GLN-TRE
Massa corporal inicial (g)	258,9 \pm 5,42	208,4 \pm 6,66	198,4 \pm 6,46	218,6 \pm 4,20	219,6 \pm 6,52
Massa corporal final (g)	345,0 \pm 3,67	183,6 \pm 3,44	176,1 \pm 5,21	234,6 \pm 4,98	257,3 \pm 12,84
Δ Massa corporal (g)	+111,8 \pm 5,80	-37,5 \pm 0,86 ^a	-36,3 \pm 1,76 ^a	+21,6 \pm 3,18 ^b	+50,0 \pm 3,51 ^b

^a = diferença estatística significativa em relação ao grupo CSS; ^b = diferença estatística significativa em relação ao grupo DSS.

A tabela 3 mostra que houve aumento estatístico significativo ($p < 0,05$) na ingestão alimentar inicial e final, na glicemia pós-prandial inicial e final, e glicemia jejum inicial e final do grupo diabético (DSS) em comparação com o grupo controle (CSS). É possível observar também que o tratamento com GLN e insulina (D-GLN-TRE) promoveu diminuição significativa ($p < 0,05$) na glicemia pós-prandial final quando comparado com o

grupo diabético (DSS). O grupo tratado apenas com insulina (D-S-TRE) apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) na glicemia jejum final quando comparado com o grupo diabético (DSS). Por fim, os resultados mostram que a adição de GLN ao grupo (D-GLN-TRE) promoveu significativamente ($p < 0,05$) uma maior glicemia de jejum final quando comparado com o grupo tratado apenas com insulina (D-S-TRE).

Tabela 3 – Ingestão alimentar inicial e final (g), glicemia pós-prandial inicial e final (g) e glicemia jejum inicial e final (g) após 30 dias de suplementação, para ratos Wistar dos grupos Controle (CSS) e Diabético (DSS) que receberam salina via oral e subcutânea; Diabéticos (D-GLN-S) suplementados com GLN 400 g/kg de peso corporal e injeção de salina subcutânea; Diabéticos (D-S-TRE) que receberam salina oral e injeção de Insulina Tresiba® (5 U/kg) subcutânea; Diabéticos (D-GLN-TRE) suplementados com GLN 400 g/kg de peso corporal e injeção de Insulina Tresiba® (5 U/kg) subcutânea.

	CSS	DSS	D-GLN-S	D-S-TRE	D-GLN-TRE
Ingestão Inicial (g)	30,10 ± 0,233	37,04 ± 0,827 ^a	34,63 ± 0,595	33,90 ± 1,297	34,26 ± 1,058
Ingestão final (g)	29,05 ± 0,213	34,19 ± 0,62 ^a	32,92 ± 0,70	34,38 ± 0,95	36,96 ± 0,69
Glicemia Pós-prandial inicial (mg/dL)	81,70 ± 2,716	489,7 ± 7,30 ^a	466,9 ± 21,01	427,7 ± 32,82	404,9 ± 35,46
Glicemia Pós-prandial final (mg/dL)	85,70 ± 2,145	502,9 ± 2,85 ^a	501,0 ± 1,00	456,5 ± 25,74	440,0 ± 24,63 ^b
Glicemia Jejum inicial (mg/dL)	69,90 ± 3,19	420,1 ± 40,97 ^a	394,0 ± 27,76	328,5 ± 19,97	325,1 ± 21,64
Glicemia Jejum final (mg/dL)	107,6 ± 2,65	551,9 ± 16,31 ^a	437,5 ± 42,40	353,8 ± 19,53 ^b	584,2 ± 23,20 ^d

^a = diferença estatística significativa em relação ao grupo CSS; ^b = diferença estatística significativa em relação ao grupo DSS; ^d = diferença estatística significativa em relação ao grupo D-S-TRE.

A análise quantitativa dos ácinos glandulares (Figuras 1A e 2) não apresentou diferença significativa na densidade acinar entre os ratos dos grupos diabéticos tratados ($p > 0,05$) quando comparados a do controle (CSS). Observou-se que uma menor densidade média dos ácinos nos grupos diabéticos D-GLN-TRE ($p < 0,001$) e D-S-TRE ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo diabético (DSS), aproximando-se assim estes grupos

com a densidade média encontrada no grupo controle (CSS).

A análise morfométrica dos ácinos glandulares (Figuras 1B e 2) revelou menor área acinar média nos ratos de todos os grupos diabéticos (DSS, D-GLN-S, D-GLN-TRE e D-S-TRE) ($p < 0,001$) em relação ao do grupo controle (CSS). No entanto, a área acinar média do grupo D-GLN-TRE foi maior em relação aos grupos DSS, D-GLN-S e D-S-TRE ($p < 0,001$).

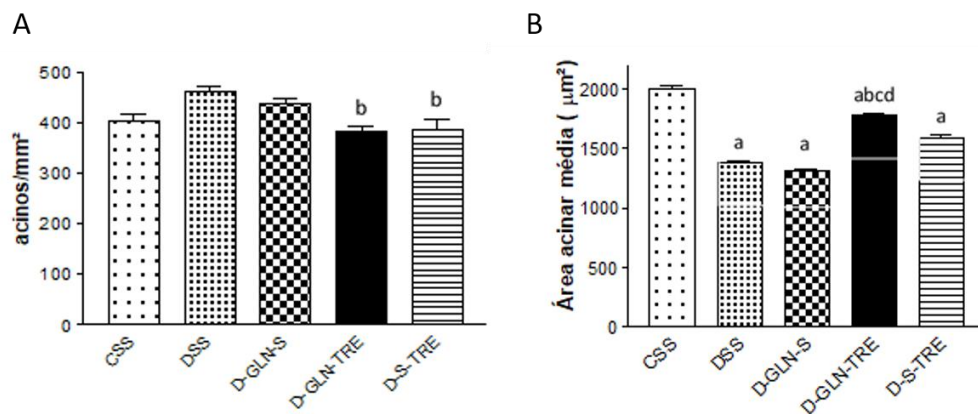


Figura 1 - Densidade acinar média (A) e área acinar média (B) da glândula salivar parótida dos ratos nos grupos: normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético e com injeção subcutânea de insulina degludeca (D-S-TRE) e diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina degludeca (D-GLN-TRE). ^a = diferença estatística significativa em relação ao grupo CSS; ^b = diferença estatística significativa em relação ao grupo DSS; ^c = diferença estatística significativa em relação ao grupo D-GLN-S; ^d = diferença estatística significativa em relação ao grupo D-S-TRE.

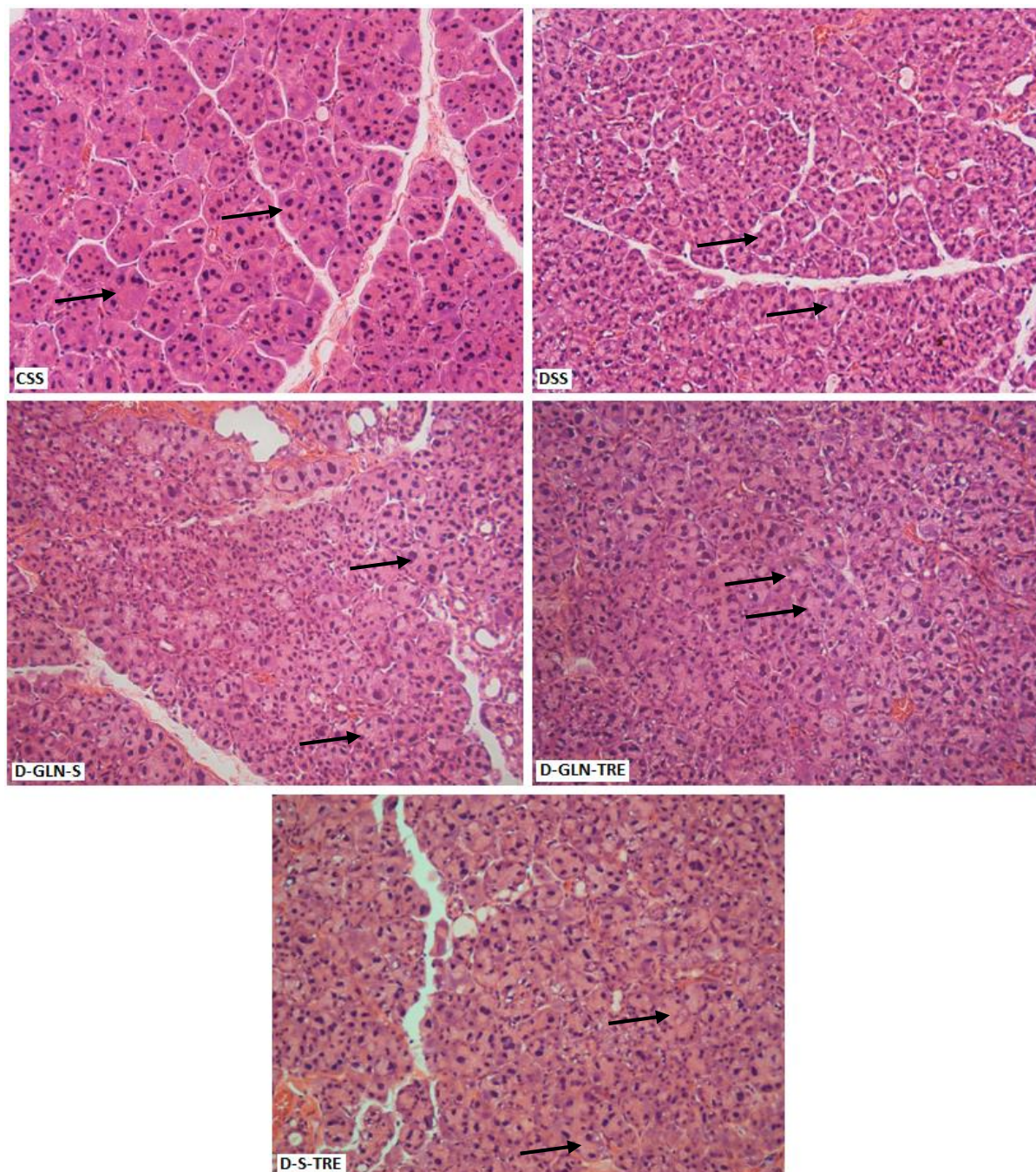


Figura 2 – Fotomicrografias de cortes histológicos das glândulas parótidas dos grupos: Normoglicêmico (CSS); diabético (DSS); diabético suplementado com L-GLN (D-GLN-S); diabético suplementado com L-GLN e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-GLN-TRE) e diabético e com injeção subcutânea de insulina Tresiba® (D-S-TRE). Setas: ácinos serosos. Coloração HE; aumento 20x.

Por meio desse estudo, verificamos que, o Diabetes promoveu diminuição da massa corporal, aumento na ingestão alimentar inicial e final, na glicemia pós-prandial inicial e final, na glicemia de jejum inicial e final, e diminuição na morfometria dos ácinos glandulares. A suplementação com GLN, em ratos diabéticos, não alterou os parâmetros estudados em relação aos animais diabéticos

não suplementados. O tratamento com insulina, em ratos diabéticos, promoveu aumento significativo de massa corporal, diminuição na densidade acinar e ligeira diminuição (porém significativa) na glicemia de jejum final. Os animais suplementados com GLN e tratados com insulina apresentaram aumento de massa corporal, ligeira diminuição (porém significativa) da glicemia pós-prandial

final, diminuição na densidade acinar e aumento na área acinar média.

As glândulas salivares apresentam sensibilidade seletiva aos danos causados por determinadas condições como o estado fisiológico de envelhecimento, Síndrome de Sjögren e DM. A glândula parótida é a mais afetada pelo estresse oxidativo gerado pelo diabetes,⁴ tanto que, em ratos com diabetes crônico, os ácinos desta glândula tem sua densidade média reduzida e os mesmos mostram-se atrofiados. Essa perda é justificada principalmente pelas seguintes condições: os ácinos serosos contêm grânulos secretores ricos em metais pesados, o que os tornam mais vulneráveis ao ataque mediado por metais via radicais livres e peróxido de hidrogênio provocados pelo acúmulo de produtos de glicação avançada – AGEs¹⁴ que induz as células acinares a sofrerem intensa ação das espécies radicalares, 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 linfocítica no parênquima glandular, que em virtude do processo inflamatório gerado, incorre em destruição tecidual.³ 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 experimental 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.,¹⁵ 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.,¹⁶ 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.

Observou-se uma tendência no aumento na densidade média dos ácinos dos ratos do grupo diabético (DSS) em relação ao grupo controle (CSS), porém, essas alterações não foram significativas. Entretanto, esses dados são importantes porque ao analisar a densidade do ácinos dos grupos D-GLN-TRE e D-S-TRE observou-se uma diminuição significativa que a encontrada no grupo diabético (DSS) e aproximando-se assim estes grupos com a densidade média encontrada no grupo controle (CSS). 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 morfométrica 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; 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 foi menor, poderiam ser visualizados em maior número ocupando a mesma área.

Através da análise morfométrica, observou-se redução da atrofia acinar na glândula parótida dos ratos diabéticos dos grupos D-S-TRE e D-GLN-TRE em relação aos dos grupos DSS e D-GLN-S; e este dado pode estar relacionado a diversos fatores que influem diretamente na morfofisiologia do parênquima glandular, sobretudo da glândula parótida. Tais fatores são elencados como: modificação na síntese e no conteúdo de proteínas,¹⁷ bem como, redução dos níveis de aquaporinas, que são essenciais para a transferência de água e no equilíbrio eletrolítico na secreção de saliva¹⁸ colaborando com a atrofia; da redução da resposta secretória da parótida às estimulações

simpática e parassimpática devido à neuropatia autonômica¹⁹ e a falta de insulina; uma vez que a manutenção da estrutura e função normal do parênquima glandular depende parcialmente deste hormônio.²⁰ Este último fator, foi observado em nosso estudo, ao constatar que os grupos D-S-TRE e D-GLN-TRE exibiram áreas acinares maiores que os grupos DSS e D-GLN-S.

A suplementação apenas com L-glutamina (D-GLN-S) não evitou que os ácinos sofressem redução de suas áreas, possivelmente, pelo fato de que, neste período de trinta dias de experimento, a glutamina pode ter sido preferencialmente requerida para outras áreas do organismo, tendo em vista que durante situações hipercatabólicas,²¹ a exemplo do que ocorre com o DM, a glutamina pode se tornar essencial para a função metabólica, o que compromete a sua disponibilidade em decorrência da implicação do metabolismo de aminoácidos em nível tecidual.

Assim podemos presumir que, mesmo com a suplementação com GLN, a sua concentração plasmática não foi suficiente para gerar efeitos benéficos expressivos, uma vez que a sua demanda torna-se maior que a produção endógena e se estabelece um quadro de deficiência de GLN.²²

Terapias adjuvantes através de suplementações, com o intuito de prevenir e/ou reduzir as complicações típicas do DM, 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 no grupo D-GLN-TRE, a ação combinada entre GLN e insulina Tresiba[®] atenuou a redução da área acinar em relação aos demais grupos diabéticos; e embora não tenha sido equiparada à morfometria acinar observada no grupo CSS, podemos considerar alguns fatos na tentativa de elucidar a melhora deste parâmetro: 1) a GLN aumenta a síntese de glutatona, potencializando as defesas antioxidantes; 2) a GLN é o aminoácido mais eficaz para induzir a liberação do peptídeo-1 como glucagon (GLP-1) secretado pelas células enteroendócrinas L gastrintestinais e que tem papel relevante na mediação da liberação

fisiológica de insulina após uma refeição;²³ 3) a GLN tem um efeito positivo na oxidação da glicose e na resistência à insulina, e estimula a liberação de insulina, bem como reduz a glicemia pós-prandial no DM;²⁴ 4) a insulina aumenta os níveis de DNA, RNA, proteína total e enzimas secretoras da glândula parótida de ratos diabéticos, desempenhando um papel importante na regulação do crescimento e função desta glândula.²⁵

CONCLUSÃO

Tanto a ação da insulina Tresiba[®], quanto a ação combinada entre GLN e insulina Tresiba[®] promoveram a manutenção da densidade acinar média, interferindo nos mecanismos citofisiológicos que promovem a manutenção da densidade dos ácinos serosos da glândula salivar parótida dos ratos diabéticos. Observou-se que o efeito protetor da GLN combinada à insulina Tresiba[®] em ratos diabéticos foi o de atenuar a atrofia acinar desta glândula, provavelmente por amenizar as injúrias causadas pelo DM.

Embora os resultados demonstrados pareçam promissores para os efeitos da glutamina sobre a densidade e morfometria acinar, são necessários estudos experimentais que considerem o tempo do período experimental e a idade dos ratos para que sejam concatenados com os resultados a curto e longo prazo das complicações observadas na glândula salivar parótida frente à condição de hiperglicemia.

REFERÊNCIAS

1. Ahmad R, Haque M. Oral health messiers: diabetes mellitus relevance. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2021 Jul; 14: 3001-3015..
2. Maciejczyk M, Kossakowska A, Szulimowska J, et al. Lysosomal Exoglycosidase Profile and Secretory Function in the Salivary Glands of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Journal of*

Diabetes Research. 2017 Dec; 2017.

3. Moreira CR, Ferrari F, Alves ÉPB, et al. Infiltração Linfocítica no Parênquima da Glândula Salivar Parótida de Ratos Diabéticos Suplementados com Acetil-L-Carnitina. *Saúde e Pesquisa*. 2014 Jan/Abr; 7(1): 83-90.

4. Knaś 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. *Journal of Diabetes Research*. 2016 Jul; 2016.

5. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radiccal Biology and Medicine*. 2003 Jan; 34(2): 145-169.

6. Roohbakhsh A, Karimi G, Iranshahi M. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2017 Jul; 91: 31-42.

7. Assis RP, Arcaro CA, Gutierrez VO, et al. Combined effects of curcumin and lycopene or bixin in yoghurt on inhibition of LDL oxidation and increases in HDL and paraoxonase levels in streptozotocin-diabetic rats. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 Jan; 18(4): 332.

8. Badole SL, Jangam GB, Chaudhari SM, et al. L-glutamine supplementation prevents the development of experimental diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *PLoS One*. 2014 Mar; 9(3): e92697.

9. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, et al. Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*. 2020 Sep; 52(9): 1496–1516.

10. Cryer PE. Mechanisms of Hypoglycemia-Associated Autonomic Failure in Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2013 Jul; 369(4): 362-372.

11. Vora J, Cariou B, Evans M, et al.

Clinical use of insulin degludec. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2015 Jul; 109(1): 19-31.

12. Haahr H, Heise T. A Review of the Pharmacological Properties of Insulin Degludec and Their Clinical Relevance. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014 Sep; 53(9): 787-800.

13. Tambascia MA, Eliashewitz FG. Degludec: The new ultra-long insulin analogue. *Diabetology and Metabolic Syndrome*. 2015 Jun; 7(1): 1-7.

14. Levi B, Werman MJ. Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *The Journal of Nutrition*. 1998 Sep; 128(9): 1442-1449.

15. Man YG, Ball WD, Marchetti L, et al. Contributions of intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. *The Anatomical Record*. 2001 Jun; 263(2): 202-214.

16. Fossati ACM, Salgado FL, Gaio EJ, et al. Estudo da morfo e citodiferenciação da glândula submandibular remanescente de ratos após excisão parcial de um de seus lobos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. 2004 Jun; 70: 323-329.

17. Al-Serwi RH, El-Kersh AOFO, El-Akabawy G. Human dental pulp stem cells attenuate streptozotocin-induced parotid gland injury in rats. *Stem Cell Research & Therapy*. 2021 Nov; 12(1): 1-18.

18. Cui F, Hu M, Li R, et al. Insulin on changes in expressions of aquaporin-1, aquaporin-5, and aquaporin-8 in submandibular salivary glands of rats with Streptozotocin-induced diabetes. *International Journal of Clinical Experimental Pathology*. 2021 Feb; 14(2): 221-229.

19. Chen S, Wang Y, Zhang C, et al. Decreased basal and stimulated salivary parameters by histopathological lesions and secretory dysfunction of parotid and submandibular glands in rats with type 2

diabetes. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2020 Feb; 19(4): 2707-2719.

20. Hand AR, Weiss RE. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Laboratory Investigation: A Journal of Technical Methods and Pathology*. 1984 Oct; 51(4): 429-440.

21. Cruzat V, Rogero MM, Keane KN, et al. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*. 2018 Oct; 10(11): 1564.

22. Rennie MJ, Bowtell JL, Bruce M, et al. Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. *The Journal of Nutrition*. 2001 Sep; 131(9): 2488S-2490S.

23. Samocha-Bonet D, Chisholm DJ, Holst JJ, et al. L-glutamine and whole protein restore first-phase insulin response and increase glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetes patients. *Nutrients*. 2015 Mar; 7(4): 2101-2108.

24. Jafari-Vayghan H, Varshosaz P, Hajizadeh-Sharafabad F, et al. A comprehensive insight into the effect of glutamine supplementation on metabolic variables in diabetes mellitus: A systematic review. *Nutrition and Metabolism*. 2020 Sep; 17(1): 1-14.

25. Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1983 Sep; 245(3): G431-G437.

Recebido em: 30.03.2022
Aprovado em: 26.07.2022