

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Avaliação de alterações no
perfil proteico da saliva de
modelo animal de obesidade

Lénia Rodrigues

Mestrado em Ciências Biomédicas

2011

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Avaliação de alterações no
perfil proteico da saliva de
modelo animal de obesidade

Lénia Rodrigues

Mestrado em Ciências Biomédicas

Dissertação orientada por:

Professora Dra. Elsa Lamy

Professora Dra. Célia Antunes

Professor Dr. José Belo

2011

Agradecimentos

Quero expressar um agradecimento muito especial à minha orientadora científica, a Doutora Elsa Lamy pelo apoio, esforço, sugestões, ensinamentos, paciência e pela disponibilidade e dedicação que sempre demonstrou em orientar esta dissertação. Sem ela este trabalho dificilmente se tinha realizado.

Ao Professor Doutor Fernando Capela e Silva por todo o apoio, incentivo, paciência, compreensão e dedicação, sem o apoio do qual este projecto dificilmente se tornava viável. Acima de tudo obrigada por me continuar a acompanhar nesta jornada e a estimular o meu interesse pelo conhecimento.

Quero agradecer à minha co-orientadora científica, a Doutora Célia Antunes, pelo tempo que me dedicou transmitindo os mais úteis conhecimentos, com confiança, e pela sua crítica sempre atempada.

Deixo um agradecimento especial à minha colega e amiga para sempre Raquel Mouta, com quem tenho vindo a trabalhar e a partilhar as alegrias e tristezas desde os tempos de licenciatura. Obrigado pelo apoio, amizade, incentivo, críticas e ideias e, acima de tudo, pelo ânimo nos dias em que nada parece dar certo.

À Professora Doutora Ana Rodrigues Costa pela disponibilidade sempre prestada, pelo apoio, ideias e conselhos tão sábios que me deu.

Agradeço também ao Professor Doutor José António Belo, director do mestrado na Universidade do Algarve, pela orientação, disponibilidade, compreensão e apoio. Não posso ainda deixar de agradecer aos colegas de laboratório da Universidade do Algarve, pelo apoio e boa disposição com que me receberam, apesar do pouco tempo que estivemos juntos, mas do qual retirei ensinamentos e conhecimentos úteis para a minha vida académica.

Às colegas de laboratório Carla, Natacha e Sandra pela ajuda prestada no tratamento dos ratinhos, pela companhia e boa disposição.

Quero deixar um agradecimento especial à D.Jesuina Mósca, técnica de laboratório, pelo apoio, prestabilidade, atenção e pela companhia que me fez nos dias que pareciam que nunca mais acabavam. Agradeço ainda às técnicas de laboratório Aida Graça e Anabela

Cabeça pela disponibilidade que sempre demonstraram quando precisei de ajuda com o tratamento dos ratinhos e com os reagentes que me cederam.

Quero agradecer à Eng^a Luisa Fialho, do laboratório de anatomia patológica, pela disponibilidade e ajuda na preparação das lâminas para histologia e com as técnicas de Imunohistoquímica.

Agradeço também à Doutora Raquel Garcia pela disponibilidade com que efectuou a análise ao óleo alimentar em que a ração dos ratinhos foi embebida.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família, em especial aos meus pais, avós e namorado por estarem sempre presentes, pela compreensão, paciência, apoio, ânimo e carinho e amor quando mais precisava. A eles devo a pessoa que sou hoje.

Índice

Agradecimentos	i
Índice de Figuras	vi
Índice de Tabelas	vii
Lista de siglas e abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract	x
1-Introdução	1
1.1- A obesidade	1
1.1.1- Regulação do comportamento de ingestão e obesidade	2
1.1.2- Obesidade e sensibilidade gustativa	6
1.2- A saliva	8
1.2.1- Tipos de saliva	9
1.2.2- As glândulas salivares	9
1.2.2.1- Tipos de glândulas salivares	9
1.2.2.2- Anatomia das glândulas salivares	11
1.2.3- A formação da saliva	12
1.2.4- Regulação da produção da saliva	13
1.2.5- Principais funções da saliva	14
1.2.6- Composição proteica da saliva	15
1.2.6.1- Amilase salivar	15
1.2.6.2- Composição da saliva de obesos	16
1.3- Modelos animais de obesidade induzida por dietas hiperlipídicas	17
1.3.1- Efeitos da indução da obesidade no metabolismo de animais modelo	18
1.4- Objectivos	20

2-Materiais e Métodos	21
2.1- Animais	21
2.2- Recolha de saliva	22
2.3- Provas de tolerância à glucose oral	23
2.4- Quantificação de proteínas na amostras	23
2.4.1- Método de Bradford	
2.4.2- Método de Lowry	24
2.5- Preparação dos géis e separação de proteínas por electroforese SDS-PAGE	24
2.6- Imunodeteção de proteínas – Western Blotting	25
2.7- ELISA para quantificação de insulina	27
2.8- Determinação dos níveis plasmáticos de leptina	28
2.9- Histologia e histomorfometria	29
2.10- Imunohistoquímica	30
2.11- Análise estatística dos dados	31
3-Resultados	32
3.1- Evolução do peso corporal	32
3.2- Consumo de alimentos	33
3.3- Níveis de glucose, leptina e insulina	35
3.3.1- Níveis de glucose no sangue	35
3.3.2- Níveis de insulina e leptina no plasma	36
3.4- Concentração proteica e expressão da amilase na saliva mista	37
3.4.1- Concentração proteica das amostras	37
3.4.1.1- Comparação entre o método de Lowry e Bradford	37
3.4.2- Comparação entre as concentrações em proteínas total da saliva	38
3.5- Western Blot para a proteína α -amilase	39
3.6- Perfil proteico salivar	40
3.7- Glândulas salivares	42

3.7.1- Análise histomorfométrica	42
3.7.1.1- Presença de lípidos nas glândulas salivares	43
3.7.2- Imunohistoquímica	44
3.7.2.1- Amilase salivar	44
3.7.2.2- Receptores de leptina (Ob-R)	46
4-Discussão	48
5-Conclusão	55
6- Bibliografia	56
Anexos	63

Índice de figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura geral dos diferentes subtipos de receptores da leptina (ObR)	3
Figura 2: Ilustração esquemática da secreção e acção da leptina	4
Figura 3: Potenciais mecanismos de resistência à leptina	5
Figura 4: Localização anatómica das principais glândulas salivares na cavidade oral	10
Figura 5: Esquema representativo da unidade básica da glândula salivar	11
Figura 6: Esquema representativo da <i>sandwich</i> utilizada para a transferência de proteínas do gel de electroforese para a membrana	26
Figura 7: Evolução do peso corporal ao longo das dezoito semanas de ensaio	33
Figura 8: Evolução do consumo de ração ao longo das dezoito semanas do ensaio	34
Figura 9: Evolução dos níveis de glucose nos grupos controlo e tratamento ao longo do ensaio	36
Figura 10: Correlação entre os níveis de leptina (ng/ml) no plasma e o peso corporal (g) dos animais no final do ensaio ($r^2 = 0,56$)	37
Figura 11: Western Blotting evidenciando a presença da proteína α -amilase nas diferentes amostras de saliva	39
Figura 12: SDS-PAGE das proteínas salivares de ratos fêmeas Wistar	40
Figura 13: SDS-PAGE das proteínas salivares de ratos fêmeas Wistar	41
Figura 14: Imagens relativas à presença de gotículas de lípidos nas glândulas parótida e submandibular e ausência dos mesmos na glândula sublingual	43
Figura 15: Imunomarcção para a α -amilase nas glândulas salivares maiores	45
Figura 16: Imunomarcção para o receptor da leptina Ob-R nas glândulas salivares maiores	47

Índice de tabelas

Tabela I: Composição em macronutrientes das rações <i>standard</i> e hiperlipídica	21
Tabela II: Anticorpos utilizados na marcação imunohistoquímica	30
Tabela III: Peso corporal, percentagem de ganho de peso, consumo, níveis de leptina no plasma e níveis de insulina no sangue de ratos ao fim de 18 semanas de dieta hiperlipídica e <i>standard</i> (média ± erro padrão da média)	32
Tabela IV: Níveis de glucose (mg/ml) ao longo de três períodos do ensaio (média ± erro padrão da média)	35
Tabela V: Valores de concentração proteica de amostras de saliva de ratos machos determinados e comparados com dois métodos diferentes	37
Tabela VI: Concentração proteica da saliva nos três grupos de animais em estudo ao longo de diferentes recolhas no ensaio (média ± erro padrão da média)	38
Tabela VII: Áreas e perímetros (pixéis) dos ácinos de diferentes glândulas salivares dos ratos pertencentes aos três grupos analisados (média ± erro padrão da média)	42
Tabela VIII: Imunomarcação para a α -amilase nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores	44
Tabela IX: Imunomarcação para o receptor da leptina (Ob-R) nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores	46

Lista de Siglas e abreviaturas

SNC- Sistema Nervoso Central

Ob-R- Receptor da Leptina

CART- Cocaine-and Amphetamine- Regulated Transcript

NPY- Neuropeptide Y

AgRP- Agouti-Related Peptide

TCR- Taste Receptor Cell

CCK- Cholecystokinin

IMC- Índice de Massa Corporal

BSA- Bovine Serum Albumin

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE- Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

APS- Ammonium Persulfate

TEMED- Tetrametiletenodiamino

PDVF- Difluoreto de Polivilideno

TBS-T- Tris-Buffered Saline-Tween

TMB- Tetrametilbenzidina

H&E- Hematoxilina e Eosina

PBS- Phosphate Buffered Saline

DAB- Diaminobenzidina

PPAR- Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

SREBP- Sterol Regulatory Element-Binding Proteins

POMC- Pro-Opiomelanocortin

Resumo

A obesidade é um problema de saúde pública, muitas vezes associado a um consumo aumentado de gordura, o que poderá ter a ver com alterações na percepção dos alimentos. A saliva é uma mistura complexa de proteínas e minerais, com funções fisiológicas importantes, tendo um papel na percepção dos alimentos. Assim, o estudo das alterações na função e composição salivares, associadas ao ganho de peso, são importantes. O objectivo geral deste trabalho foi avaliar alterações induzidas pelo consumo de uma dieta rica em gordura a nível da secreção salivar, mais concretamente a nível da proteína α -amilase, relacionando com o ganho de peso. Não havendo um modelo ideal para o estudo da obesidade, utilizaram-se ratos Wistar submetidos a uma dieta rica em gordura. Esta estirpe tem a vantagem de apresentar animais que se tornam obesos e animais resistentes a essa obesidade, quando sujeitos a este tipo de dietas. Os animais foram divididos em dois grupos, um sujeito à administração de uma dieta standard e outro de uma dieta enriquecida em óleo de girassol, durante um período de 18 semanas. Os pesos e os consumos alimentares foram controlados semanalmente. Recolheu-se saliva mista, estimulada com pilocarpina, em vários pontos do ensaio. No final os animais foram sacrificados, com recolha das glândulas salivares para avaliação histológica. Após o período de ensaio verificou-se que a dieta utilizada não induziu obesidade, ainda que se conseguissem estabelecer dois grupos de animais: mais pesados, com níveis superiores de leptina e menos pesados, com níveis inferiores. Não foram observadas alterações na secreção de α -amilase. Esses resultados podem estar relacionados com o tipo de gordura usado na formulação da ração, como é discutido no presente trabalho. Ainda assim, verificam-se diferenças no tamanho dos ácinos das glândulas salivares, sugerindo alterações na função salivar. Estudos futuros poderão ser importantes para compreender e clarificar algumas das hipóteses propostas.

Palavras-chave: *Amilase salivar, dieta rica em gordura, glândulas salivares, leptina, obesidade, receptor da leptina, saliva.*

Abstract

Obesity is a public health problem, often associated with an increased consumption of fat enriched foods, which may be related with changes in food perception. Saliva is a complex mixture of proteins and minerals, with important physiological functions, playing a role in the perception of food. Thus, the study of changes in salivary function and composition, associated with weight gain, are important. The overall objective of this study was to evaluate changes induced by the consumption of a high fat diet at the level of salivary secretion, specifically the level of the protein α -amylase, and to relate it with weight gain. As there is no one ideal model for the study of obesity, we opted for the use of Wistar rats subjected to a high-fat diet. This strain has the advantage of presenting animals that become obese when exposed to high-fat diets, and animals resistant to obesity. The animals were divided into two groups, one subjected to the administration of a diet enriched in sunflower oil, and another holding a standard diet, during 18 weeks. Weights and food consumption were monitored weekly. Mixed saliva was collected, after stimulation with pilocarpine, at various time points.

At the end, the animals were sacrificed and salivary glands collected. It was found that the diet used did not induce obesity, after a period of 18 weeks. Even so, we could establish two groups of animals: heavier, with higher levels of leptin and lighter, with lower levels of this hormone. There were no changes in the secretion of α -amilase. These results may be related to the type of fat used in ration formulation, as discussed in this work. However, there are differences in the size of salivary glands acini, suggesting changes in salivary function.

Future studies may be important to clarify some of the hypotheses.

Keywords: *High fat diet, Leptin, Obesity, Saliva, Salivary amylase, Salivary glands.*

1. Introdução

1.1 A obesidade

A obesidade consiste numa doença crónica multifactorial resultante de uma acumulação excessiva de energia na forma de gordura corporal, levando a um aumento da reserva de gordura natural até ao ponto em que passa a estar associada a certos problemas de saúde, como diabetes e dislipidémias, a um aumento das taxas de morbilidade e mortalidade. Este estado resulta de um balanço energético positivo, ou seja, quando a ingestão alimentar é superior ao gasto energético (Buettner *et al.*, 2007).

Na pré-história a luta árdua para conseguir alimentos, a maior exposição ao frio e a necessidade de movimentação constante para encontrar condições ambientais que permitissem a sobrevivência, exigiam dos nossos antepassados grande capacidade de acumular energia e de obter protecção térmica. Vários autores sugerem que, por esse motivo, o organismo desenvolveu mecanismos que facilitam a obtenção destas reservas e protecção térmica, sendo o resultado final uma produção constante de gordura. Esta capacidade de armazenar gordura tornou-se prejudicial com os padrões de vida actuais, nos quais a excessiva oferta de alimentos, particularmente alimentos ricos em gordura, associada a hábitos de conforto e de sedentarismo, conduz ao desenvolvimento da obesidade (Raizen e Oz, 2006).

A obesidade não é um fenómeno recente. As raízes históricas da obesidade provêm de há 25.000 anos atrás, sabendo-se da existência de indivíduos obesos já na época paleolítica. Artefactos de mulheres corpulentas que viveram na idade da pedra foram encontrados ao longo de toda a Europa. Além disso, também o trabalho de muitos artistas enfatizava a obesidade, esculpindo figuras corpulentas (Caro, 2002).

Apesar de ser tratada como uma condição clínica individual, a obesidade é, cada vez mais, vista como um sério e crescente problema de saúde pública, sendo que o excesso de peso predispõe o organismo a uma série de doenças, em particular doenças cardiovasculares, diabetes Mellitus tipo 2, apneia do sono e osteoartrite (Buettner *et al.*, 2007). Diversos trabalhos concluíram que o aumento da incidência da obesidade nas sociedades ocidentais nos últimos 25 anos do século XX, teve como principais causas o consumo excessivo de nutrientes combinado com o crescente sedentarismo (Caro, 2002).

A obesidade faz parte de um grupo de doenças cujo fenótipo reflecte um efeito multifactorial de diversos factores ambientais e genéticos, sendo que polimorfismos em

diversos genes que controlam o apetite e o metabolismo predis põem à obesidade (Caro, 2002).

1.1.1 Regulação do comportamento de ingestão e obesidade

O tecido adiposo tem um papel importante no armazenamento de energia sob a forma de gordura para posterior utilização pelos diversos órgãos. O tecido adiposo, constituído pelos adipócitos, secreta e sintetiza adipocitocinas, sendo estas capazes de actuar localmente de uma forma parácrina, autócrina ou endócrina (Kershaw e Flier, 2004; Fischer-Posovszky *et al.*, 2007). Uma das adipocitocinas mais importantes é a hormona leptina. A sua descoberta teve grande influência na compreensão de como o tecido adiposo comunica com outros sistemas do corpo, em especial com o Sistema Nervoso Central (SNC). A leptina é um componente integral do complexo sistema fisiológico que regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo. Esta hormona sinaliza e modula o estado nutricional do organismo para outros sistemas fisiológicos (Negrão e Licinio, 2000). Para além do seu papel na regulação do peso corporal, a leptina regula a puberdade e a reprodução, a função placentária e fetal, a resposta imune e a sensibilidade do músculo e fígado à insulina (Fischer-Posovszky *et al.*, 2007).

A leptina é sintetizada como um péptido de 167 aminoácidos e tem uma massa molecular de 14-16 KDa. É composta por quatro hélices alfa, tendo uma estrutura semelhante a uma citoquina (Shánchez *et al.*, 2005). A leptina é produzida principalmente no tecido adiposo, embora possa também ser encontrada (em poucas quantidades) no epitélio intestinal, na placenta (funcionando como um factor de crescimento para o feto), no leite materno, no músculo-esquelético, na mucosa gástrica e no cérebro (Burman *et al.*, 2009).

Diversos são os factores que influenciam a concentração de leptina no plasma, nomeadamente a massa gorda corporal, a restrição da ingestão de comida e a redução da ingestão de carboidratos (Ainslie *et al.*, 2000). Estes factores têm em comum o facto de determinarem uma diminuição na concentração de leptina (Ainslie *et al.*, 2000). Os níveis de leptina circulantes parecem estar directamente relacionados com a quantidade de tecido adiposo. Além disso, vários factores metabólicos e endócrinos contribuem para regular a transcrição dos genes da leptina em adipócitos. Por exemplo, ocorre diminuição de leptina em resposta a baixos níveis de insulina, havendo uma relação directamente proporcional entre as concentrações destas hormonas (Shánchez *et al.*, 2005).

A leptina actua mediante a sua ligação a receptores específicos. Os receptores de leptina (Ob-R) têm origem no gene *db* e são conhecidas seis isoformas dos mesmos, tendo em comum um domínio extracelular localizado no extremo aminoterminal, onde se encontra o local de ligação à leptina, e diferindo na porção terminal carboxílica (Shánchez *et al.*, 2005; Figura 1).

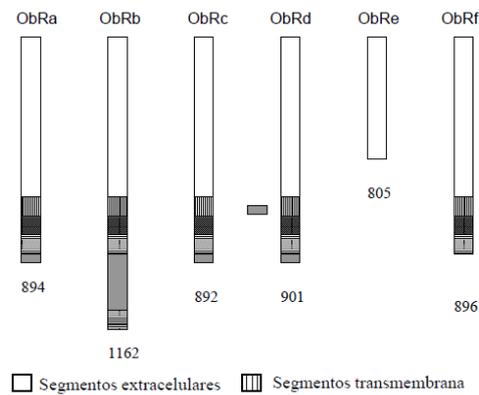


Figura 1. Representação esquemática da estrutura geral dos diferentes subtipos de receptores da leptina (ObR). O número total de resíduos de aminoácidos está indicado na parte inferior do esquema correspondente a cada subtipo (Adaptado de Sánchez *et al.*, 2005).

O receptor do neuropéptido CART induz o hipotálamo a aumentar o metabolismo, a reduzir o apetite e a aumentar a secreção de insulina, levando esta energia às células musculares (em vez de ser armazenada sob a forma de gordura) (Raizen e Oz, 2006). Por outro lado, a leptina actua também ao nível de receptores presentes no segundo grupo de neurónios (NPY/AgRP), inibindo a sua acção, ou seja, inibindo a estimulação do apetite. A figura 2 ilustra a acção da leptina integrada nos diversos sistemas do organismo.

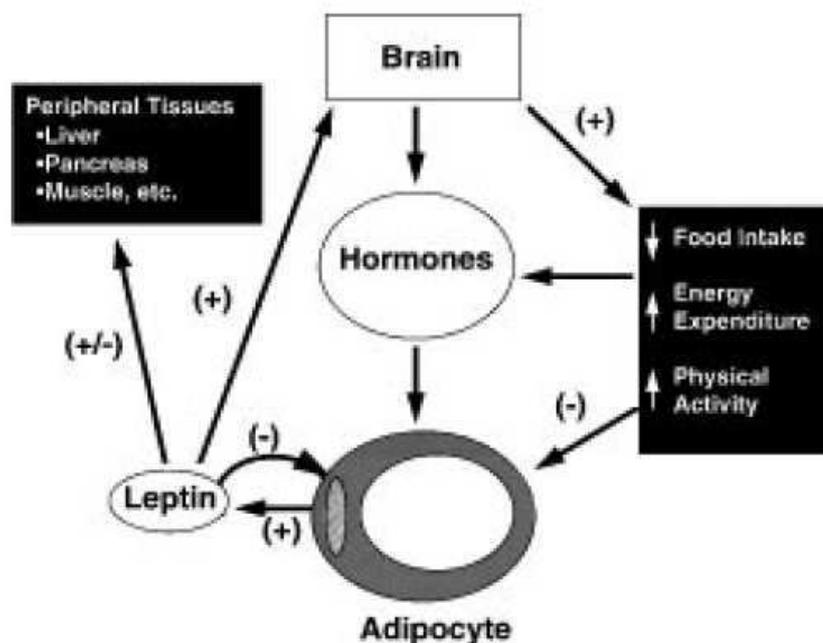


Figura 2. Ilustração esquemática da secreção e acção da leptina. A leptina é secretada pelos adipócitos para a circulação, viajando até ao cérebro, onde actua causando a estimulação ou inibição da libertação de neurotransmissores como o Neuropeptido Y (NPY), o qual actua estimulando a ingestão de alimentos, a termogénese e a actividade física. Como consequência, ocorre uma redução do tecido adiposo ou da estimulação de sinais endócrinos e/ou parácrinos que inibem a síntese e secreção de leptina pelos adipócitos. A leptina pode também afectar directamente o metabolismo e a função dos tecidos periféricos como o fígado e músculo-esquelético: (+), Estimulação; (-) inibição; (+/-) estimulação e/ou inibição; ↑ aumenta; ↓ diminui (Adaptado de Houseknecht *et al.*, 1998).

Uma vez que se chegou à conclusão que a leptina diminui a sensação de fome, seria lógico pensar que, quanto maior a quantidade de adipócitos maior seria a quantidade de leptina circulante e, conseqüentemente, maior a sensação de saciedade. No entanto, tal facto não se verifica na obesidade.

Os efeitos da leptina sobre o apetite e o gasto energético sugerem que existe um “defeito” na actividade desta hormona em pacientes com obesidade (Negrão e Licinio, 2000). Desde o início destes estudos ficou clarificado que as pessoas com obesidade têm níveis de leptina proporcionais à sua massa de tecido adiposo (Negrão e Licinio, 2000). No entanto, verificou-se que existe uma insensibilidade à acção desta hormona, em parte devido a alterações nos receptores de leptina ao nível do cérebro, em pessoas obesas. Como consequência dessas alterações, os transportadores de leptina ficam saturados e não a transportam até ao cérebro (Negrão e Licinio, 2000). Outros estudos referem que a obesidade

está relacionada com a diminuição dos níveis de receptores de leptina solúveis circulantes, o que, por sua vez, leva ao decréscimo da acção da leptina (Shánchez *et al.*, 2005).

“Defeitos” circulatórios também podem resultar numa resistência à leptina. A forma molecular em que as hormonas circulam no sangue pode ter um impacto importante na sua actividade biológica. Muitos membros da família das citocinas podem circular ligadas a proteínas do soro, sendo que estas proteínas de ligação podem aumentar ou diminuir a actividade biológica do ligante. No que diz respeito à leptina, esta circula especificamente ligada a três proteínas no soro, verificando-se que a leptina ligada a proteínas fica saturada na obesidade (Houseknecht *et al.*, 1998). A identificação precisa dessas proteínas e os mecanismos que regulam essa expressão e interacção com a leptina ainda não são conhecidos. Além disso, tem sido demonstrado que a leptina é transportada para o cérebro por um sistema saturável e que a eficiência do transporte de leptina é reduzida em pacientes obesos (Houseknecht *et al.*, 1998). A figura 3 ilustra os possíveis cenários moleculares que podem levar à resistência à leptina.

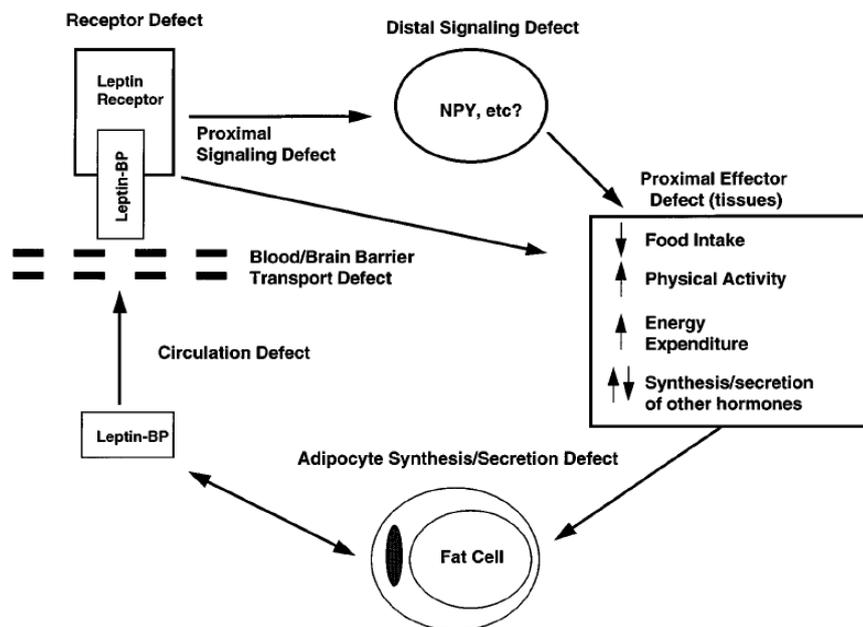


Figura 3. Potenciais mecanismos de resistência à leptina. A resistência à leptina pode ser devida a defeitos na leptina ligada a proteínas, ou no transporte de leptina através da barreira “sangue-cérebro”. A resistência à leptina pode ser também devida a defeitos na sinalização de receptores de leptina ou a defeitos ao nível dos tecidos efectores. Finalmente, essa resistência pode ser devida a defeitos ocorridos durante a síntese/segredo de leptina ao nível dos adipócitos. NPY, Neuropeptído Y; Leptin-BP, leptina ligada a proteínas; ↑aumenta; ↓diminui (Adaptado de Houseknecht *et al.*, 1998).

1.1.2 Obesidade e sensibilidade gustativa

Um factor a ter em conta na obesidade é a palatibilidade dos alimentos que, com os avanços na indústria alimentar, pode ser agora maior do que teria sido durante a evolução dos nossos sistemas de controlo alimentar. Os sistemas cerebrais evoluíram para que os sinais internos, como a distensão gástrica e o aumento dos níveis de glicose e outros sinais gastrointestinais e hormonais, pudessem agir de forma a diminuir as sensações sensoriais produzidas pela alimentação, de modo a parar de comer no final de uma refeição. No entanto, a maior palatibilidade dos alimentos modernos pode fazer com que este equilíbrio seja alterado, fazendo com que seja ingerida uma quantidade de alimento superior à necessária (Rolls, 2007).

As células receptoras do gosto (TRC- *Taste Receptor Cell*), presentes principalmente na língua, palato e orofaringe, constituem o local de recepção das moléculas sápidas, sendo a partir destas células que sinais nervosos são transmitidos ao SNC para que haja a identificação dos gostos. Assim sendo, têm um papel determinante a nível da sensibilidade gustativa. Apesar de ser uma área que não é completamente compreendida, há estudos que mostram uma acção de factores de apetite/saciedade a nível dos TRC, sendo os mais comuns os neuropeptídeos Colecistocinina (CCK), glucagina e péptido YY (Wisser *et al.*, 2009). A CCK, em particular, cuja função é o aumento da saciedade, tem sido observada como moduladora da excitabilidade eléctrica em TRCs (Wisser *et al.*, 2009). Nestas células, a CCK inibe a entrada de potássio e aumenta a concentração intracelular de cálcio. As TRCs que respondem à acção da CCK com um aumento da concentração intracelular de cálcio são aquelas que também são muito sensíveis aos estímulos amargo do quinino e da cafeína (Hajnal *et al.*, 2005).

Tendo em conta esta acção de um dos sinais de saciedade, a nível das estruturas responsáveis pela recepção do gosto, é possível que outros péptidos/hormonas, envolvidos na regulação do comportamento de ingestão, também actuem a nível da sensibilidade gustativa, como é o caso da leptina. Há estudos que referem a sua secreção na saliva e uma acção a nível das estruturas da língua. Foi sugerido que a leptina influencia a resposta gustativa para o gosto doce através da regulação da expressão de receptores de leptina presentes nas células receptoras do gosto (Kawai *et al.*, 2000). Um estudo recente (Umabiki *et al.*, 2010) observou que um decréscimo nos níveis séricos de leptina, após perda de peso, estava significativamente associado a uma diminuição do limiar de detecção do gosto doce, ou seja,

que havia um aumento da sensibilidade para este gosto. Verificou-se também um aumento da expressão de receptores de leptina, nos gomos gustativos, bem como alterações na expressão dos receptores para o gosto doce com o decréscimo de peso e a diminuição dos níveis de leptina (Chen *et al.*, 2010).

A variação apresentada em termos de sensibilidade gustativa tem, pelo menos em parte, uma base genética. Tem sido sugerido que indivíduos *supertasters* apresentariam, em média, um menor Índice de Massa Corporal (IMC) que indivíduos *non-tasters*, ou seja, indivíduos com baixa sensibilidade gustativa. Tal facto tem por base a hipótese que os primeiros começam a rejeitar alimentos a partir de concentrações mais baixas dos vários sabores, particularmente doce e gordura (revisto em Tepper *et al.*, 2008). Nesse sentido, seria de esperar que indivíduos *non-tasters* tivessem taxas de ingestão mais elevadas e, conseqüentemente, IMCs mais elevados. No entanto, vários estudos realizados até agora indicam que, enquanto este comportamento se observa para pessoas com IMC dentro do considerado “normal”, para indivíduos pré-obesos e obesos não existe tanto consenso, com observações, por parte de alguns autores, de *supertasters* com os maiores valores de IMC (Bartoshuk *et al.*, 2006; Tepper *et al.*, 2008).

No que diz respeito às potenciais alterações na sensibilidade gustativa entre obesos e normoponderais, a maior parte dos estudos foi realizada para os gostos doce e gordura (Donaldson *et al.*, 2009), sendo os resultados menos esclarecedores para os restantes gostos básicos. Só recentemente, num estudo realizado com mulheres obesas, foram encontradas alterações na sensibilidade para o gosto umami, tendo-se observado uma relação negativa entre esta e o IMC, ou seja, mulheres obesas necessitam de maiores concentrações de glutamato monossódico para detecção do seu gosto umami, e preferem concentrações mais elevadas deste (Pepino *et al.*, 2010). Isto vai no sentido de alguns autores que têm vindo a apontar que indivíduos obesos têm preferência por alimentos ricos em proteína, para além das referidas preferências por alimentos doces e ricos em gordura. Há ainda alguns estudos que não referem preferência por doce e apontam apenas para um aumento das preferências por alimentos ricos em gordura e proteína (Donaldson *et al.*, 2009). No entanto, este continua a ser um assunto pouco compreendido, havendo mesmo dúvidas quanto a uma possível generalização das preferências para os dois géneros, pois há artigos que referem que enquanto as mulheres preferem alimentos doces e ricos em gordura, os homens preferem alimentos ricos em proteína e gordura (Donaldson *et al.*, 2009). Estes resultados apresentam algumas inconsistências devido à dificuldade no estabelecimento de uma metodologia ideal para este tipo de avaliação em humanos, dada a componente afectiva e subjectiva das respostas aos

estímulos gustativos (Bartoshuk *et al.*, 2006; Donaldson *et al.*, 2009). Para crianças, os estudos parecem ser mais consensuais. Neste caso, observa-se que crianças com maior sensibilidade (ou seja, que detectam níveis mais reduzidos) para o gosto doce consomem maiores quantidades de alimentos com este sabor, e apresentam maior IMC (Keller e Tepper, 2004).

Tem sido estabelecida uma ligação entre a função dos TCRs e a obesidade, sendo que diversos estudos têm demonstrado um aumento da sensibilidade gustativa em ratos obesos (Hajnal *et al.*, 2005).

1.2 A saliva

A obesidade é uma patologia cuja compreensão requer o estudo de outros sistemas fisiológicos do organismo. O estudo da saliva é muito importante na compreensão da obesidade e das desordens metabólicas inerentes a esta doença, uma vez que a saliva é o fluido que está presente constantemente na cavidade oral e tem um papel muito importante ao nível da percepção dos alimentos e nas escolhas alimentares (Spielman, 1990).

A saliva é um fluido composto por mais de 99 % de água. Esta é uma secreção mucoserosa ligeiramente acídica (pH entre 6 e 7), representando uma mistura complexa de fluidos provenientes de glândulas salivares maiores e de glândulas salivares menores e do fluido crevicular gengival, contendo bactérias orais e detritos de alimentos (Humphrey *et al.*, 2001). Trata-se de uma solução hipotónica, permitindo a percepção de gostos diferentes pelas papilas gustativas (Humphrey *et al.*, 2001).

A saliva é composta por uma variedade de electrólitos, incluindo sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos, por proteínas, como imunoglobulinas, enzimas (por exemplo amilase e lisosima), mucinas (glicoproteínas envolvidas na protecção e prevenção do epitélio oral), por enzimas microbianas e por produtos nitrogenados, como ureia e amónia. A proporção relativa dos diferentes componentes varia em função das alterações no fluxo salivar. Os componentes salivares, particularmente as proteínas, são multifuncionais, pois uma proteína pode ter mais do que uma função, redundantes, pois várias proteínas diferentes têm funções semelhantes (Humphrey *et al.*, 2001).

A saliva possui também um papel na percepção gustativa. A saliva funciona como solvente para as substâncias sápidas no processo inicial de percepção gustativa, transportando as moléculas para os locais de recepção do gosto. Durante este processo, os constituintes da saliva podem interagir, em termos físicos e químicos, com essas substâncias, modulando a sensibilidade gustativa (Spielman, 1990). Tanto os iões presentes na saliva, como as proteínas

salivares parecem poder modular a forma como o alimento é percebido. Por exemplo, a presença de iões com poder tampão, vai diminuir a sensibilidade para o gosto ácido (Matsuo e Yamamoto, 1992; Matsuo, 1999). As proteínas salivares também têm um papel importante na percepção gustativa. Por exemplo, a amilase salivar inicia a digestão de amido na boca e isto pode ter influência na percepção gustativa dos carboidratos (Lamy, 2010).

1.2.1 Tipos de saliva

Existem dois tipos principais de secreção salivar: secreção serosa e secreção mucosa. A primeira, a serosa, é uma secreção fluida rica em água e com enzimas e outras proteínas. Tem um papel importante na ingestão e na mastigação dos alimentos. É secretada pelas glândulas de secreção serosa: glândulas parótidas e por algumas glândulas salivares menores, como as glândulas de Von Ebner. A secreção mucosa é rica em glicoproteínas tais como mucinas, actuando preponderantemente na gustação e deglutição. É secretada pelas glândulas de secreção mucosa: glândulas sublinguais e submandibulares e diversas glândulas salivares menores (Palamim, 1999).

1.2.2 As glândulas salivares

A saliva é uma secreção exócrina de células especializadas agrupadas em ácinos das glândulas salivares. Estas glândulas fazem parte do aparelho digestivo como glândulas anexas e encontram-se distribuídas pela cavidade oral (Douglas, 2002). Há três pares de glândulas salivares maiores: as parótidas, as submandibulares e as sublinguais. As secreções destas glândulas ajudam a manter a cavidade oral húmida e iniciam o processo da digestão (Douglas, 2002). Nos mamíferos existem ainda outros tipos de glândulas, glândulas salivares menores. Estas glândulas (estima-se entre 600 a 1000) existem como pequenas massas discretas que ocupam a submucosa na maior parte da cavidade oral. Os únicos locais onde elas não se encontram são a gengiva aderida, a face dorsal do terço anterior da língua e a porção do terço anterior do palato duro (Cate, 1998).

1.2.2.1 Tipos de glândulas salivares

As glândulas salivares são glândulas exócrinas e podem dividir-se em: glândulas salivares maiores (parótidas, sublinguais e submandibulares; Figura 4) e glândulas salivares

menores (glândulas salivares acessórias, variam em tamanho e estão largamente espalhadas no lábio, na membrana mucosa bucal, na língua, no palato e na região intramaxilar).

As glândulas parótidas são glândulas serosas que produzem uma saliva serosa, apresentando ácinos de forma esférica constituídos por células serosas. Estas glândulas estão localizadas anteriormente ao ouvido, de cada lado da cabeça, entre o ramo da mandíbula e o processo estilóide do temporal, estando intimamente associada aos ramos periféricos do nervo facial (Guebur *et al.*, 2004). A parótida é enervada por componentes do sistema nervoso simpático e parassimpático (Moore, 1992).

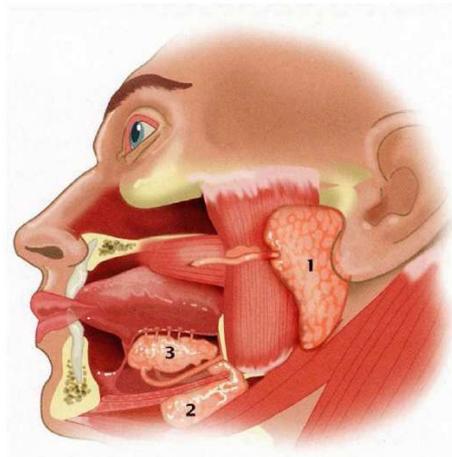


Figura 4. Localização anatômica das principais glândulas salivares na cavidade oral; 1- Parotida, 2-Submandibular, 3- Sublingual (adaptado de Aps e Martens, 2005).

As glândulas submandibulares estão localizadas ao longo do limite inferior da metade posterior da mandíbula. A partir desta glândula abre-se um canal que atravessa anteriormente e em profundidade a mucosa do pavimento bucal. No que respeita á enervação, esta é efectuada por fibras parassimpáticas do gânglio submandibular (Moore, 1992).

As glândulas sublinguais estão localizadas imediatamente abaixo da mucosa do pavimento bucal. Estas glândulas são maioritariamente mucosas apesar de apresentarem meias-luas serosas a rodear os ácinos mucosos. (Guebur *et al.*, 2004). Esta glândula apresenta uma enervação parassimpática e simpática, sendo a enervação parassimpática da glândula sublingual a continuação da enervação da submandibular, enquanto que a enervação simpática deriva do gânglio cervical superior (Moore, 1992).

1.2.2.2 Anatomia das glândulas salivares

As glândulas salivares apresentam a forma de uma estrutura ramificada, constituídas por um sistema de ductos com estruturas secretoras terminais, os ácinos (Figura 5). O ducto secretor principal da glândula divide-se em ductos estriados que se tornam progressivamente mais pequenos. Por sua vez, os ductos estriados ramificam-se em pequenos ductos intercalares que terminam nos ácinos. Os ductos intercalares iniciam o processo de transporte dos produtos de secreção, continuando pelos ductos estriados e passando finalmente pelo ducto excretor, até chegar à cavidade oral (Ellis *et al.*, 1991).

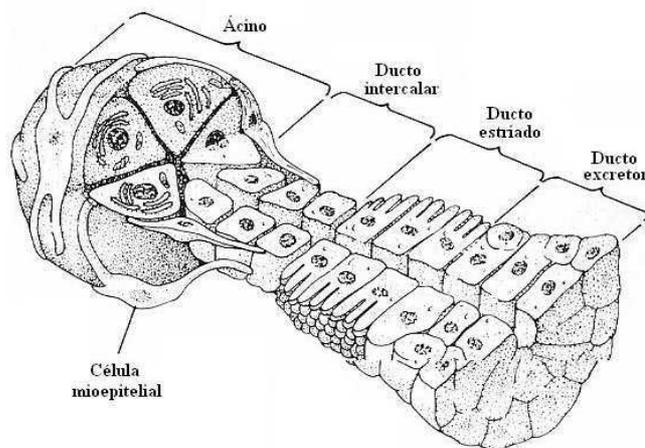


Figura 5. Esquema representativo da unidade básica da glândula salivar (adaptado de Regezi, 1989).

Os ácinos são as principais unidades produtoras de saliva e constituem a parte inicial da glândula. Estes variam consideravelmente de forma, tamanho e número de células. Geralmente as glândulas mucosas apresentam ácinos terminais de forma tubular, enquanto que os das glândulas serosas apresentam uma forma esférica (Ellis *et al.*, 1991). Os principais tipos de células acinares são as células serosas e as células mucosas.

As células mucosas, ao microscópio óptico, apresentam uma forma piramidal, com um núcleo basal achatado e normalmente são maiores que as células serosas (Ellis *et al.*, 1991). As células mucosas são responsáveis pela secreção da saliva mucosa e ao nível ultraestrutural têm menor densidade electrónica e poucos grânulos no citoplasma, os quais são grânulos mucinogénicos secretores de mucina. Apresentam ainda um complexo de Golgi proeminente

e o retículo endoplasmático, mitocôndrias e outros organelos estão normalmente confinados à zona basal ou lateral da célula (Ellis *et al.*, 1991). Estas células mucosas encontram-se principalmente nas glândulas submandibulares e sublinguais e em diversas glândulas salivares menores (Anderson, 1998).

As células serosas apresentam uma forma piramidal e são responsáveis pela secreção da saliva serosa. Apresentam um núcleo arredondado localizado no terço basal da célula. Nestas células encontram-se grânulos secretores na zona apical do citoplasma. Estas células apresentam vilosidades na sua membrana apical (Ellis *et al.*, 1991). As células serosas existem principalmente nas glândulas salivares maiores, predominando na glândula parótida, diminuindo na submandibular e sendo quase escassas na sublingual. Também as glândulas salivares menores de von Ebner, situadas na língua, são constituídas por células serosas (Anderson, 1998).

O sistema de ductos é composto pelo ducto intercalar, ducto estriado e ducto excretor terminal. O ducto intercalar é responsável pela secreção primária do fluido salivar, estando localizado próximo dos ácinos e sendo composto essencialmente por células cubóides. Os ductos intercalares, constituídos por epitélio simples cúbico, comunicam com os ductos estriados, sendo estes constituídos por epitélio simples colunar. Por fim, o ducto excretor é formado por epitélio estratificado escamoso. Estes ductos são responsáveis pela alteração da composição da saliva e a sua secreção na cavidade oral (Anderson, 1998).

Junto aos ácinos e ductos intercalares, interpostas no espaço entre a membrana basal e a membrana plasmática da célula epitelial, encontram-se as células mioepiteliais. A sua morfologia depende da sua localização, e cada célula consiste de um corpo central com núcleo, de onde partem 4 a 8 prolongamentos que abraçam as células epiteliais. As relacionadas com os ductos intercalares são fusiformes com menos prolongamentos. Todas elas estão relacionadas com capacidade contráctil auxiliando na secreção do fluido salivar e da maioria das proteínas salivares (Anderson, 1998). Não são visíveis pela coloração de rotina de hematoxilina e eosina.

1.2.3 A formação da saliva

A saliva é formada em duas fases: uma primeira que ocorre nos ácinos e uma segunda fase em que há uma modificação devido à passagem pelos ductos. A primeira secreção é formada activamente pelo movimento dos iões sódio e cloreto para o lúmen acinar, dando

origem a um gradiente osmótico que leva ao movimento passivo de água. Outros componentes acinares são aqui adicionados, antes do fluido entrar nos ductos. Nos ductos salivares os iões sódio são activamente reabsorvidos e os iões potássio e bicarbonato são secretados e adicionados ao fluido final. Os componentes macromoleculares são formados no retículo endoplasmático das células acinares, processados em vesículas secretoras no complexo de Golgi e exportados para o exterior por exocitose (Harris *et al.*, 1998).

1.2.4 Regulação da produção de saliva

A secreção do fluido salivar é controlada pelas enervaçãoções simpática e parassimpática do sistema nervoso autónomo. Apesar das duas divisões do sistema nervoso autónomo controlarem de modo diferente a secreção de fluido e electrólitos e a secreção de proteínas, na realidade, ao nível das glândulas salivares, a actividade de um dos ramos actua de forma sinérgica com o outro, potenciando o seu efeito (Emmelin, 1987). O sistema parassimpático (através da acção nos receptores muscarínicos e colinérgicos) está principalmente associado à secreção de fluido, e o sistema nervoso simpático (através da acção nos receptores beta-adrenérgicos) à síntese e secreção proteica.

Apesar de alguns autores referirem não existir qualquer acção hormonal na iniciação da salivacção (Mese e Matsuo, 2007), alguns estudos têm apontado para uma regulação da secreção salivar por parte de alguns péptidos, pelo menos a nível da síntese proteica (Aras e Ekström, 2006a,b; 2008).

Os centros salivares primários recebem *inputs* de estruturas neuronais do tronco cerebral e do prosencéfalo, estando o prosencéfalo relacionado com *inputs* sensoriais, nomeadamente gosto e sensações orais, e o tronco cerebral com a regulação da ingestão e temperatura corporal, respectivamente (Matsuo, 1999).

A produção de saliva está intimamente ligada ao consumo de alimento. Vários factores podem iniciar a secreção salivar, designadamente *inputs* sensoriais, como a visão, o gosto, o olfacto e o tacto, estímulos orofaríngeos e/ou esofágicos, e até o simples pensar em alimentos (Pedersen *et al.*, 2002; Mese e Matsuo, 2007). Por outro lado, são também vários os factores que afectam o volume e a composição da saliva segregada, nomeadamente: o ritmo circadiano (Dawes, 1972), o género (Inoue *et al.*, 2006), factores fisiológicos (Dawes, 1987), drogas (Scully, 2003), nível de actividade física (Dawes, 1981) e valor hedónico dos alimentos (Mese e Matsuo, 2007), entre outros. Para além destes, doenças como a síndrome de Sjögren (van

der Reiden *et al.*, 1996), bulimia nervosa (Riad *et al.*, 1991), diabetes (Rao *et al.*, 2009), carências vitamínicas (Glijer *et al.*, 1985), e várias outras doenças sistêmicas (von Bültzingslöwen *et al.*, 2007) também resultam em alterações nas glândulas salivares e na composição da saliva produzida.

1.2.5 Principais funções da saliva

Podem ser consideradas cinco funções principais da saliva: (1) lubrificação e protecção, (2) acção tamponizadora e actividade antibacteriana, (3) manutenção da integridade dos dentes, (4) reparação tecidual e (5) gosto e digestão (Humphrey *et al.*, 2001).

Como revestimento seromucoso, a saliva lubrifica e protege os tecidos orais. Os principais componentes lubrificantes da saliva são as mucinas salivares. As mucinas são glicoproteínas com uma fracção glucídica, têm propriedades de baixa solubilidade, elevada viscosidade e elasticidade e forte aderência. Mastigação, fala e deglutição são processos auxiliados pelo efeito lubrificante das mucinas. As mucinas desempenham também actividade antibacteriana através da modulação selectiva da adesão de microrganismos aos tecidos orais, contribuindo para o controlo da colonização bacteriana e fúngica (Humphrey *et al.*, 2001).

A acção tampão da saliva deve-se principalmente à sua composição em bicarbonatos, fosfatos, ureia, proteínas anfotéricas e enzimas. O bicarbonato é o sistema tampão mais importante, neutralizando os ácidos. A capacidade tampão da saliva evita a colonização da boca por microrganismos potencialmente patogénicos, negando-lhes a optimização das condições ambientais. Além disso, a saliva contém um espectro de proteínas com propriedades antibacterianas, como é o caso da histatina e da lisozima, sendo esta última uma enzima que pode hidrolisar a parede celular de algumas bactérias (Humphrey *et al.*, 2001).

A manutenção da integridade dos dentes é outras das funções desempenhadas pela saliva. Este fluído é saturado com iões cálcio e fosfato, garantindo as trocas iónicas direccionadas à superfície dos dentes. Essa troca começa aquando da erupção do dente pois, embora a coroa esteja completamente formada do ponto de vista morfológico, nesse momento, ela é cristalograficamente incompleta. A interacção com a saliva resulta em maturação pós-erupção através difusão de iões, como o cálcio, fósforo, magnésio e cloreto, para a superfície dos cristais de apatite do esmalte. Essa maturação aumenta a dureza da superfície, diminui a permeabilidade e aumenta a resistência do esmalte às cáries (Humphrey *et al.*, 2001).

A saliva é necessária para dissolver substâncias a serem degustadas e transportá-las até aos locais de recepção/detecção do gosto (células receptoras do gosto localizadas nas papilas gustativas), permitindo que as papilas gustativas reconheçam o sabor do alimento, fazendo com que ele seja digerido, informando o cérebro acerca do gosto do alimento. A saliva contém também uma proteína denominada gustina, a qual é necessária ao crescimento e maturação dos corpúsculos gustativos (Humphrey *et al* 2001).

1.2.6 Composição proteica da saliva

A saliva é constituída por um elevado espectro de proteínas imunológicas e não imunológicas, tais como imunoglobulinas, enzimas, aglutininas, histatinas, proteínas ricas em prolina, cistatinas, entre outras (Almeida *et al.*, 2008).

A saliva é um fluido único e um meio de diagnóstico muito importante de diversas doenças. A literatura está repleta de artigos que descrevem o uso da saliva para a detecção de várias doenças bucais e sistémicas (Streckfus e Bisles, 2001). Avanços na utilização da saliva como fluido de diagnóstico têm sido tremendamente influenciados pela evolução tecnológica. Por exemplo, a capacidade de medir e acompanhar uma gama de componentes moleculares da saliva e compará-los com os componentes do soro tornou viável a utilização da saliva para o estudo de marcadores químicos e imunológicos (Streckfus e Bisles, 2001). A saliva é hoje usada como meio de diagnóstico de diversas doenças endócrinas, cardiovasculares, infecciosas, oncológicas e monitorização de drogas (Streckfus e Bisles, 2001).

1.2.6.1 Amilase salivar

A principal enzima digestiva da saliva é a α -amilase, estando esta presente, em humanos, na saliva da parótida em concentrações de 60-120 mg/100ml, e na saliva da submandibular em concentrações de aproximadamente 25mg/100ml (Harris *et al.*, 1998). É uma proteína existente na saliva com diferentes isoformas (entre as quais isoformas glicosiladas), com massa moleculares aparentes que podem variar entre 55 e 67 KDa (Hirtz *et al.*, 2005; da Costa *et al.*, 2008). A α -amilase desempenha a sua principal função no processo inicial da digestão, hidrolisando a ligação glicosídica α 1:4 entre as unidades de glucose na cadeia de polissacarídeos de amido. A hidrólise ocorre em qualquer local ao longo da cadeia. Os produtos finais da digestão da amilase são principalmente maltose, juntamente com

oligossacarídeos bem como alguns níveis de bicarbonato formado por células das glândulas metabolicamente activas (Harris *et al.*, 1998).

A proporção relativa da enzima α -amilase pode ser modificada consoante o tipo de dieta e o constituinte predominante da dieta. Estudos realizados por Gidez (1973) em roedores mostram que uma dieta rica em amido leva a um aumento dos níveis de amilase. Por outro lado, uma dieta rica em gordura (50% - 60%) faz com que os níveis de amilase aumentem significativamente, quando comparados com os níveis de amilase de ratinhos alimentados com uma dieta pobre em gordura.

1.2.6.2 Composição da saliva de obesos

Alterações metabólicas podem influenciar a síntese, composição e secreção da saliva. A hipofunção das glândulas salivares, e a consequente redução da taxa de fluxo, pode estar presente em algumas situações como diabetes Mellitus e obesidade. (Pannunzio *et al.*, 2010). O aumento da gordura corporal durante a infância e a adolescência está frequentemente associado com os sistemas respiratório, cardiovascular, esquelético, endócrino e gastrointestinal. Os adipócitos não se limitam a armazenar gordura, actuando também sobre as células que secretam hormonas. Alterações hormonais estão presentes na obesidade em crianças e adolescentes. (Pannunzio *et al.*, 2010).

Estudos recentes realizados por Pannunzio *et al* (2010) evidenciam diferenças na composição da saliva de crianças obesas e com excesso de peso em relação a crianças com peso ideal (grupo controlo). Este estudo analisou parâmetros salivares como o pH, a taxa de fluxo, capacidade tampão, concentração proteica, concentração de fosfatos, cálcio e ácido siálico e a actividade da enzima peroxidase. Foi observado que crianças com excesso de peso têm o pH da saliva mais elevado do que crianças obesas e com peso ideal. Verificaram ainda que não existem alterações na taxa de fluxo salivar e na capacidade tampão da saliva entre os três grupos. Relativamente à concentração de fosfatos, verificou-se que esta é menor em crianças com excesso de peso. A concentração de ácido siálico encontra-se mais elevada na saliva de crianças obesas, enquanto que a actividade da peroxidase é menor em crianças obesas e com excesso de peso. Por fim, verificou-se que a saliva de crianças obesas tem um conteúdo proteico mais elevado em relação aos outros dois grupos.

Estudos recentes desempenhados por Mizuuchi e Taketa (1999) evidenciaram as diferenças na actividade da amilase salivar no soro entre crianças obesas e crianças com peso normal. Os resultados obtidos mostraram uma diminuição na actividade da amilase salivar em

crianças obesas, sendo que esse efeito é revertido quando ocorre uma diminuição do peso corporal, constatando-se um aumento da atividade da proteína em estudo.

1.3 Modelos animais de obesidade induzida por dietas hiperlipídicas

Mesmo que os modelos animais não possam ser considerados exatamente com as mesmas características dos humanos, eles são de grande valor no estudo das condições bioquímicas, fisiológicas e patológicas envolvidas na acumulação excessiva de gordura. Apesar da existência de vários modelos animais para o estudo da obesidade, nenhum deles consegue representar completamente esta patologia, dada a sua característica multifactorial.

De entre as diversas estirpes de roedores utilizadas no estudo da obesidade, existem algumas que contêm mutações em determinados genes sendo, por isso, animais geneticamente obesos. Por outro lado, existem modelos que não são geneticamente obesos mas que são susceptíveis à obesidade induzida pela dieta. Exemplos de tal são os roedores Sprague-Dawley dos quais existem animais que ficam obesos mediante uma dieta hipercalórica - “*Obesity-Prone*” e animais que quando submetidos à mesma dieta não desenvolvem obesidade - “*Obesity resistant*”. Diversos estudos referem também os ratos Wistar como modelos por também apresentarem fenótipos “*Obesity-prone*” e “*Obesity resistant*” (De La Serre *et al.*, 2010; Ainslie *et al.*, 2000).

A variação fenotípica entre os modelos “*Obesity-prone*” e “*Obesity resistant*” pode ser devida a uma expressão alterada dos genes hipotalâmicos, sensibilidade à leptina, estimulação simpática ou programação epigenética (Buettner *et al.*, 2007). Os ratos “*Obesity resistant*” acumulam gordura visceral apenas quando sujeitos a uma dieta rica em gordura muito pronunciada e contendo o mínimo de proteínas, preferindo estes, quando lhe dão a escolher, carboidratos em vez de gordura. Pelo contrário, os ratos “*Obesity-prone*” tornam-se obesos em quase todas as condições de uma dieta rica em gordura (Buettner *et al.*, 2007).

Existe o consenso de que um aumento da palatibilidade dos alimentos doces e/ou com níveis de gordura elevados desempenham um papel crítico na ingestão total de calorias (Hajnal *et al.*, 2005). Tal como acontece nos humanos, também os alimentos ricos em carboidratos e gordura são os preferidos por ratos, sendo que os sinais pós-ingestivos desempenham um papel importante nessa preferência. Assim, existem resultados que demonstram que os efeitos desses nutrientes são suficientes para induzir e manter a ingestão.

Tem sido estabelecido que uma dieta rica em alimentos preferidos pelos ratos é o suficiente para estabelecer a obesidade nesses animais. Estudos recentes têm demonstrado que ratos obesos têm preferência por alimentos ricos em sacarose e frutose, ou seja, alimentos doces para o homem (Hajnal *et al.*, 2005).

1.3.1 Efeitos da indução da obesidade no metabolismo de animais modelo

Uma das vantagens da utilização de modelos animais de obesidade induzida por dietas ricas em gordura é que este tipo de dietas pode induzir a obesidade e desordens metabólicas em roedores, assemelhando-se à síndrome metabólica humana. De certo modo, estes modelos aproximam-se mais do que acontece com o desenvolvimento da obesidade em humanos, em que são raros os casos de alterações unicamente genéticas. As primeiras descrições de intervenções nutricionais datam de 1940 (Buettner *et al.*, 2007). Estudos subsequentes têm revelado que uma dieta rica em gordura promove a hiperglicémia e a resistência à insulina (Buettner *et al.*, 2007).

É grande a variabilidade das dietas usadas nestes estudos experimentais, existindo desde dietas ricas em gorduras animais a dietas ricas em gorduras vegetais, para além das grandes variações que existem nos teores de gordura presentes (variações de teores de gordura entre 20 a 60% do total de macronutrientes). Muitos trabalhos têm definido uma dieta semi-purificada, na qual a gordura é substituída por carboidratos e/ou proteínas (Buettner *et al.*, 2007).

Estudos já realizados com roedores (Buettner *et al.*, 2007) descrevem que uma alimentação prolongada rica em gordura induz um aumento do peso corporal nos roedores de 10 a 20% em comparação com o grupo controlo. A indução da obesidade é mais eficaz quando a dieta é iniciada logo na fase jovem e continua durante muitas semanas. O ganho de peso corporal durante esse período é gradual e só se começam a obter os primeiros resultados após duas semanas de alimentação rica em gordura, tornando-se os resultados mais visíveis ao fim de quatro semanas.

É hoje conhecido que há sempre uma fracção de animais que, mesmo sujeitos a uma dieta rica em gordura, não se tornam obesos. Estudos recentes têm demonstrado que os animais mais susceptíveis à obesidade são hiperfágicos, tendo uma possível resistência à acção anorexigénica da leptina e uma diminuição da expressão hipotalâmica de péptidos anorexigénicos, como a hormona estimulante de α -melanócitos (Buettner *et al.*, 2007).

Normoglicemia, hiperglicemia ligeira e desenvolvimento de diabetes tipo 2, têm sido identificados em diferentes regimes de dieta. Alguns estudos têm revelado que uma alimentação rica em gordura durante muitas semanas leva a uma hiperglicemia moderada, um aumento dos níveis de glucose e um aumento dos níveis de insulina no plasma. Além destes parâmetros, também se tem verificado uma hipertrigliceridemia em jejum quando se submete o animal a uma dieta rica em gordura, tanto animal como vegetal (Buettner *et al.*, 2007). Também os níveis de leptina tendem a ser mais elevados nestas condições (Buettner *et al.*, 2007).

1.4 OBJECTIVOS

Hoje em dia, cada vez mais a obesidade é um fenómeno progressivo e uma epidemia que não se consegue erradicar. O estudo dos processos fisiológicos, metabólicos e hormonais inerentes a esta doença são de extrema importância, mas a sua compreensão é ainda reduzida.

Uma dos factores determinantes na escolha da dieta é a percepção do alimento na cavidade oral. A saliva é o principal fluido constituinte do ambiente exterior das células receptoras do gosto e, como tal, desempenha um papel fundamental na sensibilidade gustativa.

O trabalho em causa tem como principal objectivo avaliar de que forma uma dieta hiperlipídica (e os factores inerentes ao seu consumo, como por exemplo a quantidade ingerida e consequente mastigação) altera a função salivar e a sua relação com os níveis de leptina plasmáticos. Com esse objectivo debruçamo-nos na análise da expressão da proteína amilase salivar, a qual reflecte o funcionamento, principalmente, da glândula parótida. Por outro lado, esta enzima também tem um papel importante a nível da digestão dos hidratos de carbono, podendo ser importante na sua percepção. Em simultâneo, estudaram-se as três glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) a nível histológico, nomeadamente histomorfometria, e expressão da amilase e de receptores de leptina.

Aproveitando as evoluções de metodologias e equipamentos na área da proteómica, este trabalho visa contribuir para um melhor conhecimento da composição da saliva de obesos e possibilitar o desenvolvimento de estudos subsequentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Para a realização do trabalho experimental foram utilizados 21 ratos Wistar fêmeas. Os animais nasceram entre 24 de Outubro e 05 de Novembro de 2010. Todos os animais foram mantidos num sistema com temperatura (23-24°C) e humidade (60%) reguladas, num ciclo de luz claro-escuro 12/12h. Um mês depois do nascimento os animais foram desmamados, tendo passado para gaiolas individuais com ração standard (SAFE A04) e água *ad libitum* durante quatro semanas (período de pré-ensaio), após o que foram separados em dois grupos, de forma aleatória: grupo controlo (N=7) e grupo tratamento (N=14). O grupo controlo continuou a alimentar-se com a mesma ração standard do período de pré-ensaio, passando o grupo tratamento a ser alimentado com ração hiperlipídica *ad libitum*.

A ração hiperlipídica obteve-se embebendo a ração standard em óleo de girassol alimentar, de uma marca comercial, durante 3 a 4 dias no escuro. Após este período a ração foi seca em estufa, não ultrapassando uma temperatura de 40°C, e armazenada de modo a ficar protegida da luz.

Foram retiradas amostras de ração antes e depois de esta estar embebida em óleo, de modo a proceder-se à determinação em macronutrientes (análise proveniente do Laboratório de Nutrição Animal do ICAAM, Universidade de Évora). A composição das rações *standard* e hiperlipídica são apresentadas na Tabela I.

Tabela I. Composição em macronutrientes das rações *standard* e hiperlipídica.

Parâmetros	Ração standard	Ração hiperlipídica
Proteína Total (%)	17,4	14,5
Hidratos de Carbono (%)	53,65	48,2
Gordura Total (%)	2,7	14,7
Kilocalorias (Kcal/g)	3,1	3,8

Ao longo do período de ensaio, os animais foram pesados duas vezes por semana, registando-se as médias dos pesos semanais. O consumo de ração foi também controlado ao

longo de todo o ensaio. Uma vez por semana procedeu-se à medição do comprimento e do perímetro abdominal dos animais.

Ao fim de um mês do início do ensaio procedeu-se à avaliação das glicemias em jejum e pós-prandiais dos animais, de modo a avaliar o efeito da ingestão de uma dieta rica em gordura a nível da sua tolerância à glucose. O procedimento foi repetido mais duas vezes até ao final das 18 semanas do ensaio.

De modo a proceder-se à determinação da concentração proteica da saliva destes animais, foram efectuadas recolhas de saliva antes do início, durante e no fim do ensaio.

O ensaio teve a duração de dezoito semanas, findas as quais os animais foram anestesiados e sacrificados por punção cardíaca, tendo-se feito a recolha de sangue, para a avaliação dos níveis plasmáticos de insulina e leptina e para recolha dos três pares de glândulas salivares maiores, para análise histológica.

Os animais foram mantidos nas condições determinadas pela legislação em vigor na União Europeia, relativa à experimentação animal (FELASA, <http://www.felasa.eu>) e em Portugal (Portaria 1005/92). Todos os procedimentos envolvendo os animais foram supervisionados por um investigador reconhecido pela *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA).

2.2. Recolha de saliva

A recolha de saliva mista foi feita após injeção subcutânea de pilocarpina (*Pilocarpine hydrochloride*, Sigma, P6503), numa dose de 7mg/Kg de peso vivo (solução de 40mg/ml em solução salina NaCl 9%). Este fármaco mimetisa a acção do sistema nervoso autónomo parassimpático (através de acção a nível dos receptores muscarínicos) (Muenzer, 1979). A saliva produzida, em resposta a este agonista parassimpático, é mais rica em água, sendo, desta forma, mais fluida e diluída, sem que o tipo de espécies proteicas presentes seja alterado (Muenzer, 1979), conseguindo-se assim recolher um volume de amostra suficiente para análise.

Poucos minutos após a injeção de pilocarpina os animais começaram a salivar. A saliva mista foi recolhida directamente da boca do animal, por aspiração com uma micropipeta, e colocada imediatamente em tubos de 1,5ml (ou de 2 ml) mantidos em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5min, 10000G, 4°C). O precipitado formado foi rejeitado e o sobrenadante transferido para um novo tubo e armazenado a 20°C até análise.

2.3 Provas de tolerância à glucose oral

Os valores de glicemia foram determinados no sangue total recolhido através da veia caudal. A primeira recolha foi feita aos animais após um jejum de 16 a 18h. Após esta primeira determinação foi administrado um “bolus” de glucose (1,75g glucose/Kg peso vivo), numa solução de 25% (m/v) em água. A administração foi feita por sonda gástrica. Foram feitas novas determinações dos valores de glicemia aos 30, 60, 90 e 120 minutos. As medições foram realizadas utilizando um glicómetro (Accutrend Sensor, Boehringer Mannheim) e tiras teste (Accu-chek para glucose, Roche).

2.4 Quantificação de proteína nas amostras

Tendo em conta a inexistência de um método ideal para todos os tipos de proteínas, e de forma a determinar o mais adequado para quantificação de proteínas na saliva de ratos, testaram-se dois métodos distintos: o método de Lowry e o método de Bradford.

2.4.1 Método de Bradford

A quantificação proteica, pelo método de Bradford, foi feita através da utilização do reagente Bio-Rad Protein Assay. Para traçar a curva de calibração, foram utilizadas concentrações de 50, 100, 200, 350 e 500 μ g/mL de albumina do soro bovino BSA (*Bovine Serum Albumin*), preparando inicialmente uma solução-mãe, com concentração de 500 μ g/mL, a partir da qual foram feitas as respectivas diluições.

As amostras de saliva foram descongeladas, em gelo, diluídas 5X, 10X, 30X e 60X. Foram aplicados 10 μ l de cada solução de BSA e o mesmo volume de cada amostra, em triplicado, em diferentes poços da microplaca. Posteriormente, adicionaram-se 200 μ L do reagente corante *Coomassie Brilliant Blue G-250*, preparado de acordo com as indicações do Kit (BIO-RAD Protein Assay). Após incubação à temperatura ambiente, durante 10 minutos, foram feitas as leituras de absorvância a um comprimento de onda de 630nm, num leitor de microplacas (Microplate reader, Biotek, ELX 800). Para cada placa, traçou-se uma recta de calibração com os valores médios das absorvâncias de cada padrão em função da quantidade de proteína. Por interpolação, e tendo em conta o factor de diluição, calculou-se a quantidade de proteína para cada um dos triplicados das amostras.

2.4.2 Método de Lowry

Na realização deste método, as amostras foram descongeladas e mantidas em gelo durante o seu manuseamento. Foram preparadas diluições de 10X, 20X e 40X. Para a obtenção de uma curva de calibração foram utilizadas concentrações diferentes de soluções padrão de albumina do soro bovino BSA (50, 75, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$), preparadas de modo semelhante ao descrito para o método de Bradford. Cada concentração da solução de BSA e cada uma das diluições das amostras de saliva foram analisadas em triplicado.

Adicionou-se 1mL de Reagente de Lowry (sulfato de cobre: tartarato de sódio e potássio: carbonato de sódio, na proporção 1:1:98) a 600 μl de cada amostra de saliva já diluída, agitou-se no vórtex e incubou-se durante 10 minutos no gelo. Seguidamente, adicionaram-se 100 μl de reagente de Folin (Folin: água bi-destilada, na proporção 1:1) ao preparado anterior, agitou-se no vórtex e incubou-se durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo de incubação procedeu-se à leitura da absorvância das amostras a um comprimento de onda de 720 nm no espectrofotómetro (Hitachi). Traçou-se uma recta de calibração com os valores médios das absorvâncias de cada padrão em função da quantidade de proteína. Por interpolação e tendo em conta o factor de diluição, calculou-se a quantidade de proteína para cada um dos triplicados das amostras.

2.5 Preparação dos géis e separação de proteínas por electroforese SDS-PAGE

Para a realização da electroforese SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) foram preparados géis (de 8 x 10 cm e 1 mm de espessura). O gel de resolução (12% acrilamida) consistiu em 5mL de Tris-HCl 1.5M, pH 8.8, 200 μl de SDS, 8mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 6,8mL de água bidestilada, 150 μL de APS (*Ammonium Persulfate*) 0,1 g/mL e 10 μl de TEMED. Esta mistura foi então colocada nas placas de vidro, sem criar bolhas, até 1 cm abaixo do topo do vidro da frente e adicionou-se água bidestilada sobre o gel de modo a evitar o contacto da mistura com o ar. A mistura ficou a polimerizar durante cerca de 45 minutos. Passado o tempo de polimerização, foi aplicado o gel de concentração (4% acrilamida), consistindo em 2mL de Tris-HCl 0,5, pH 6.8, 80 μL de SDS, 4,86mL de água bidestilada, 1,06mL de acrilamida/bis-acrilamida 30%, 48 μL de APS e 8,8 μL de TEMED.

Após a polimerização os géis foram colocados num sistema Protean mini (Bio-Rad). As câmaras superiores e inferiores foram cheias com tampão de corrida (0,025M Tris, 0,192M glicina, 1% (m/v) SDS). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (0,125M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS (m/v), 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol, quantidade vestigial de azul de bromofenol). Foram aquecidas num banho seco, a 95°C, durante 5 minutos, e em seguida colocadas em gelo, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel, num volume correspondente a uma quantidade de proteínas de 10 µg por poço. Num dos poços de cada um dos géis foram aplicados 5 µL de um marcador de massas moleculares (Dual Color da Bio.Rad, Ref. 161-0324). As proteínas foram separadas a uma voltagem constante de 140 V. A corrida electroforética decorreu até que a frente de corrida atingiu o final do gel.

No final da corrida electroforética, os géis foram corados em solução 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 em 50% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, e descorados numa solução de 20% (v/v) metanol e 10% (v/v) ácido acético, a qual foi mudada várias vezes até as bandas serem visíveis e o fundo ficar claro.

As imagens foram obtidas através de digitalização num scanner (HP ScanJet 3400C). A análise das imagens foi feita com recurso ao software TotalLab Quant. Este software permite a análise do volume relativo das bandas, corrigindo pequenas diferenças existentes entre as quantidades de proteína corridas em cada lane e permitindo, assim, uma mais correcta comparação intra- e inter-géis, minimizando erros devido a alguma variabilidade inerente à técnica. De modo a verificar se existem diferenças na expressão proteica das diferentes amostras, foi comparado a percentagem de volume das bandas, calculada no programa TotalLab Quant, não só entre as várias amostras aplicadas no mesmo gel, como também entre as várias amostras aplicadas nos diferentes géis.

2.6 Imunodeteção de proteínas - Western Blotting

Para se efectuar esta técnica, inicialmente procedeu-se à separação proteica por electroforese SDS-PAGE, tal como está descrito acima, com a diferença que neste caso as quantidades de proteína aplicadas em cada poço foram de 3 µg e utilizados géis com uma espessura de 0,75 mm.

Após as proteínas terem sido separadas em gel, preparou-se o tampão de transferência [Tris-HCl 25mM, pH 8.3; glicina 192mM; metanol 20%; SDS 0,037% (m/v)]. Antes de iniciar a transferência das proteínas do gel para a membrana de PDVF (difluoreto de

polivilideno), a mesma teve que ser activada, o que consistiu em colocá-la 5 segundos numa solução de metanol, seguindo-se de 5 minutos em água destilada e 10 minutos em tampão de corrida. Posteriormente, cortaram-se duas folhas de papel de filtro com o tamanho aproximado do gel de resolução.

Seguidamente, embebeu-se a membrana, o papel de filtro e as placas em tampão de transferência e preparou-se a *sandwich*, ou seja, por cima de uma das superfícies internas da cassette colocou-se uma placa de fibra humedecida, seguindo-se por esta ordem: papel de filtro humedecido, gel, membrana de PDVF, segundo papel de filtro e placa de fibra (Figura 6). Todos estes componentes foram colocados de modo a evitar a formação de bolhas de ar que pudessem diminuir o contacto entre o gel e a membrana.

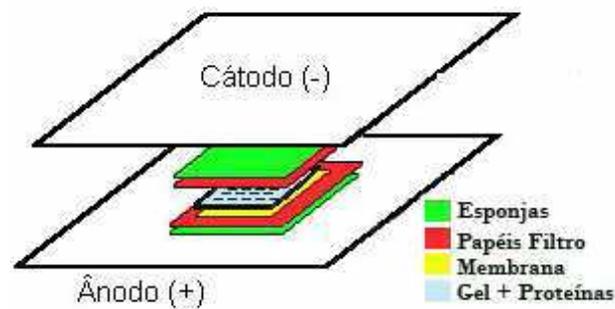


Figura 6. Esquema representativo da *sandwich* utilizada para a transferência de proteínas do gel de electroforese para a membrana.

(Retirado de <http://imunologiahematologia.wordpress.com/2010/06/14/western-blot/>)

Colocou-se a unidade de arrefecimento e encheu-se completamente o reservatório com tampão de transferência. A transferência ocorreu a uma corrente constante de 350 mA durante 1 hora. Após a transferência a membrana foi mergulhada numa solução corante Ponceau S durante 10 minutos, com agitação suave, seguida de lavagens em várias passagens com água destilada à temperatura ambiente. Esta coloração teve como objectivo visualizar as bandas proteicas e confirmar o sucesso da transferência.

Seguidamente colocou-se a membrana na solução de bloqueio [5% (m/v) leite em pó em TBS-T] durante 2 h à temperatura ambiente com agitação. Posteriormente, incubou-se a membrana com o anticorpo primário anti- α -amilase (Sc-46657, Santa Cruz Biotechnology), numa diluição de 1:200, *overnight*, a 4°C, após a que se efectuaram três lavagens, de 15 minutos cada, com uma solução de lavagem [0,5% (m/v) de leite em pó em TBS-T]. As lavagens foram feitas com agitação suave. Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo

secundário (anti-mouse; diluição 1:10000) à temperatura ambiente durante 2 horas, com agitação, seguida de três lavagens, de 15 minutos cada, em solução de lavagem.

No final, procedeu-se à revelação da membrana. Adicionou-se o substrato (reagente quimiofluorescente, fosfatase alcalina), através da sua aplicação, em gotas justapostas, numa placa de plástico. Colocou-se a membrana em contacto com o reagente durante alguns segundos, retirou-se o excesso de líquido e procedeu-se à aquisição da imagem num transiluminador (Bio-Rad). A análise das imagens adquiridas foi feita com recurso ao software Quantity-one (Bio-Rad).

2.7 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) para quantificação da Insulina

A técnica ELISA consiste num teste imunoenzimático utilizado para quantificar a insulina presente no plasma de ratos Wistar.

A primeira etapa do ensaio consiste no revestimento de microplacas de poliestireno, de 96 poços (Nunc-Immuno Plate Maxisorp C96, Nunc, Roskild, Dinamarca) com uma solução contendo o anticorpo anti-insulina (Bio-trend, ref^o BT53-3033-39, lote 040706A). O procedimento consiste em adicionar 100 µL da solução de anticorpo a cada poço. No final procede-se à selagem da placa para evitar perdas por evaporação. A incubação faz-se *overnight*, durante 16h, a 4°C.

Procede-se à lavagem da placa, tendo como objectivo a eliminação das moléculas de anticorpo não adsorvidas à fase sólida. O procedimento experimental envolve repetidas lavagens (tipicamente 3) dos compartimentos com 200 µL de tampão de lavagem, à temperatura ambiente. Após a lavagem, invertem-se as placas sobre papel absorvente de forma a remover a totalidade da solução de lavagem. Na saturação da placa com BSA, promove-se a ligação de BSA aos locais deixados vagos na microplaca pelo anticorpo. Esta etapa é fundamental para eliminar ligações inespecíficas dos outros componentes do ensaio à placa, assegurando-se desta forma que o antígeno e o conjugado se ligam exclusivamente ao anticorpo que reveste as placas. Colocam-se tipicamente 190 µL da solução de saturação em cada poço, incubando-se a placa durante 1h a 4°C. Procede-se novamente à lavagem da placa.

Em seguida dá-se a ligação do antígeno à peroxidase, adicionando-se 50 µL dos padrões e amostras a cada compartimento. Imediatamente após o preenchimento da placa com padrões e amostras, adiciona-se a cada poço 50 µL de insulina-peroxidase (Sigma I-2133, lote

101H8071) na diluição 1:4000 em tampão do enzima. Procede-se à incubação durante 4h a 4°C, e novamente à lavagem da placa. A reacção enzimática da peroxidase inicia-se com a adição de 100 µL do substrato (TMB-*tetrametilbenzidina, liquid substrate system*, SIGMA) a cada compartimento. A reacção decorre à temperatura ambiente, na ausência de luz durante 15-30 min. O produto resultante da reacção enzimática é uma substância de cor azul (TMB oxidado) cujo espectro de absorção exhibe dois máximos, a 370 e 655 nm. A reacção pode ser interrompida por adição de uma solução de ácido sulfúrico 0,5 M (100 µL/compartimento). Em consequência, ocorre uma alteração da cor da solução de azul para amarelo. O espectro do composto resultante exhibe um máximo de absorção entre 400 e 500 nm. A densidade óptica desta solução deve ser determinada recorrendo ao método de duplo filtro, efectuando a leitura a 450 nm e usando a leitura a 630 nm como referência.

2.8 Determinação dos níveis plasmáticos de leptina

Foi utilizado um Kit (EZRL-83K Millipore) para quantificação da concentração de leptina em soro e plasma de ratos, baseado no método ELISA (Enzyme – *Linked Immunosorbent Assay*). Primeiramente procedeu-se à ligação da leptina na amostra por um anti-soro pré-titulado, resultando na imobilização dos complexos em poços de uma placa de microtitulação. De seguida, e após a lavagem, adicionou-se um anticorpo biotinilado (anticorpo secundário), o qual se liga ao anticorpo primário imobilizado. O passo seguinte consiste na ligação da enzima peroxidase ao anticorpo secundário. Por fim, ocorre o desenvolvimento de coloração pela actividade da enzima na presença do substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina.

De acordo com as recomendações do fabricante, a actividade enzimática é medida espectrofotometricamente pela absorção aumentada a 450nm, corrigido a partir da absorção a 590nm, após acidificação dos produtos formados. No nosso caso, e devido à ausência de filtro para leitura a um comprimento de onda de 590nm, as leituras foram feitas a 450 e 630 nm. O aumento da capacidade de absorção é directamente proporcional à quantidade de leptina capturada, presente nas amostras. Os valores das amostras em estudo são determinados através de interpolação de uma curva de referência gerada pela utilização de soluções de concentrações conhecidas (padrões de referência), aplicadas na mesma placa. Na mesma placa em que se aplicaram as soluções para traçar a curva e as amostras, foram aplicadas também duas soluções como controlos de qualidade (QC1 e QC2), as quais servem para avaliar a

qualidade dos resultados. Todas as soluções (incluindo padrões e controlos de qualidade; 10 µL) foram aplicadas em duplicado. É utilizada uma solução ácida (HCL 1M) para parar a reacção quando se começa a desenvolver a cor.

2.9 Histologia e histomorfometria

As glândulas salivares principais foram dissecadas, lavadas brevemente com tampão fosfato 0,1M (pH 7.4), e fixadas em tampão formalina neutro 10% durante 24 horas. De seguida procedeu-se ao seu processamento pelas técnicas histológicas de rotina, em sistema automático: inclusão em parafina e corte em micrótopo rotativo, em secções com 5 µm de espessura. Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro de 75x25 mm e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) para observação da estrutura geral e avaliação histomorfométrica.

As secções das glândulas salivares foram observadas através de microscopia fotónica com um microscópio Nikon Eclipse 600 (Nikon, Kanagawa, Japan). Para cada animal dez fotomicrografias digitais, de áreas escolhidas aleatoriamente, de cada uma das glândulas salivares foram recolhidas com câmara Nikon DN100 (Nikon, Kanagawa, Japan), tendo as glândulas sido observadas e fotografadas com uma ampliação 200x, no caso da parótida, e de 100x no caso das submandibular e sublingual. Para cada animal, as áreas e os perímetros de, pelo menos 1000 ácinos das glândulas parótida, sublingual e submandibular, foram medidos através do software SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA). Apenas as estruturas histológicas cujos limites eram claramente definidos foram consideradas na medição.

2.10 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando os anticorpos primários contra alfa amilase e receptor da leptina (Tabela II) pelo método da Streptavidina-biotina-peroxidase (UltraVision Sistema de Detecção de Kit, NeoMarkers, USA, ref^a TP-015-HD), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela II. Anticorpos utilizados na marcação imunohistoquímica

Anticorpo	Fonte	Referência	Diluição	Incubação
Amilase (G-10)	Santa Cruz	sc-46657	1:500	60 min, temperatura ambiente
	Biotechnology	(<i>mouse monoclonal</i>)		
Ob-R (B-3)	Santa Cruz	sc-8391	1:50	30 min, temperatura ambiente
	Biotechnology	(<i>mouse monoclonal</i>)		

Resumidamente: secções de 5 µm de espessura, dos mesmos blocos da análise histológica, foram estendidas em lâminas de vidro de 75x25 mm, tratadas com polilisina, desparafinizadas em xilol e re-hidratadas em graduações decrescentes de álcool até água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogénio a 3% em metanol (1 parte de H₂O₂ a 30%, para 9 partes de metanol absoluto), durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*; pH 7,4), três vezes por dois minutos. Antes da incubação com os anticorpos primários, os cortes foram pré-tratados para recuperação antigénica, em solução tampão citrato (pH 6,0), a 98°C durante 20 minutos, após o que foram arrefecidos, durante 20 minutos, à temperatura ambiente e lavados em PBS, três vezes por dois minutos. Para a diminuição das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com a solução de bloqueio durante 5 min à temperatura ambiente, após o que foram incubados, em câmara húmida com os respectivos anticorpos primários (Tabela II). Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com anticorpo secundário biotilado durante 15 minutos, em câmara húmida à temperatura ambiente. Logo após foram lavados em PBS, três vezes por dois minutos, e tratados com o conjugado Streptavidina-peroxidase durante 15 minutos em câmara húmida à temperatura ambiente, sendo lavados novamente em PBS, três vezes por dois minutos, e submetidos à revelação com o cromogénio castanho [DAB, Diaminobenzidina], durante 5 minutos. Os

cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto, posteriormente lavados em água corrente, durante 1-2 minutos, e desidratados em graduações de álcool, clarificados em xilol e montados com Entellan (Merck, nº. 107961). Para a interpretação dos resultados foram incubadas secções adjacentes como controlos negativos: (a) sem o anticorpo primário e (b) com soro normal (concentração semelhante à do anticorpo primário).

Relativamente à expressão das proteínas as lâminas foram também examinadas em microscópio fotónico Nikon Eclipse 600 sendo as imagens obtidas através de câmara digital Nikon DN100. A intensidade da coloração e a localização de células/estruturas imunorreactivas foram avaliadas em, pelo menos, uma secção de cada glândula por animal, por um observador que desconhecia o grupo a que pertenciam os animais. A imunocoloração foi avaliada de forma qualitativa de acordo com a seguinte escala: - (negativo); + (imunomarcacão fraca); ++ (imunomarcacão moderada); +++ (imunomarcacão forte).

2.11 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram analisados para a normalidade (teste Kolmogorov-Sminorff) e homocedaticidade (teste Levene). Os dos pesos e glicemia apresentavam distribuição normal, tendo sido usada análise de variância (one-way ANOVA) para avaliar as diferenças entre grupos, no que diz respeito aos pesos e GLM (*general-linear model*) ANOVA para avaliar as diferenças entre grupos e, dentro dos diferentes grupos, ao longo das várias recolhas. Os dados relativos às concentrações em proteína total das várias amostras de saliva, bem como a percentagem de volume das bandas dos géis corados com CBB-R250 e das membranas imunomarcadas para a amilase salivar, apresentavam distribuição normal, tendo as diferenças entre os diferentes grupos avaliada através de one-way ANOVA. No que diz respeito aos dados relativos à análise histomorfométrica das glândulas salivares (áreas e perímetros), estes não apresentavam nem distribuição normal, nem homocedaticidade. Assim, a análise foi feita através de testes não paramétricos (Kruskal-Wallis). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada com recurso ao software SPSS versão 18.

As diferenças foram consideradas para um intervalo de confiança de 95%. A análise estatística foi efectuada com recurso aos softwares NCSS 2001 e SPSS (v.18).

3. RESULTADOS

3.1 Evolução do peso corporal

Após dezoito semanas de ingestão de uma dieta hiperlipídica, rica em óleo de girassol, verificou-se que os animais não ganharam mais peso comparativamente aos animais submetidos a dieta standard para roedores (ver Tabela III, Figura 7 e Anexo I).

Tabela III: Peso corporal, percentagem de ganho de peso, consumo, níveis de leptina no plasma e níveis de insulina no sangue de ratos ao fim de 18 semanas de dieta hiperlipídica e standard (média \pm erro padrão da média).

	Controlo	Mais pesados	Menos pesados
Peso corporal inicial (g)	182,1 \pm 9,7 ^a	210,7 \pm 8,9 ^b	175,3 \pm 8,9 ^a
Peso corporal final (g)	268,7 \pm 5,9 ^a	311,1 \pm 5,5 ^b	258,6 \pm 5,5 ^a
Ganho peso (%)	86,6 \pm 9,1	100,4 \pm 8,4	83,3 \pm 8,4
Consumo (g)	19,7 \pm 0,3 ^b	18,3 \pm 0,2 ^a	15,9 \pm 0,2 ^c
Consumo (Kcal)	60,7 \pm 1 ^a	70 \pm 0,9 ^b	61,2 \pm 0,9 ^a
Consumo/peso metabólico (Kcal)	1,2 \pm 0,02	1,3 \pm 0,02	1,3 \pm 0,02
Leptina (ng/ml)	2,5 \pm 0,3 ^a	3,7 \pm 0,3 ^b	2,1 \pm 0,2 ^a
Insulina (ng/ml)	0,74 \pm 0,05	0,74 \pm 0,06	0,96 \pm 0,42

Letras minúsculas iguais indicam que não existem diferenças entre os valores na mesma linha (Tukey–Hsu test; $P < 0.05$).

Comparando os pesos finais entre o grupo controlo e o grupo tratamento não se observam diferenças significativas (Grupo controlo: 268,7 \pm 5,9; Grupo tratamento: 284 \pm 8,24). No entanto, é possível considerar dois subgrupos dentro do grupo de animais sujeitos à dieta hiperlipídica: um subgrupo de animais mais pesados, cujo peso médio é significativamente mais elevado que o dos animais controlo, e um subgrupo de animais menos pesados, cujo peso final se mantém semelhante ao dos animais controlo (tabela III). Estes grupos foram considerados para a análise dos resultados obtidos para os vários parâmetros estudados.

Apesar da diferença entre os pesos finais destes três grupos, este facto não é atribuído ao consumo da dieta enriquecida em óleo de girassol, uma vez que os pesos iniciais já eram significativamente diferentes e a percentagem de ganho de peso não foi diferente entre os

grupos. Esse resultado é comprovado quando se calcula o ganho de peso percentual, indicando-nos que não existem diferenças significativas entre os grupos (tabela III).

No entanto, verifica-se aqui que é possível fazer-se uma separação no próprio grupo sujeito á ração hiperlipídica em dois subgrupos, tendo em conta o peso corporal em gramas. Assim, há animais do grupo tratamento que apresentam maior peso final e cuja tendência é para um maior ganho de peso, ainda que a diferença não seja significativa. A figura 7 ilustra a separação dos animais nos três grupos e mostra a tendência evolutiva do peso.

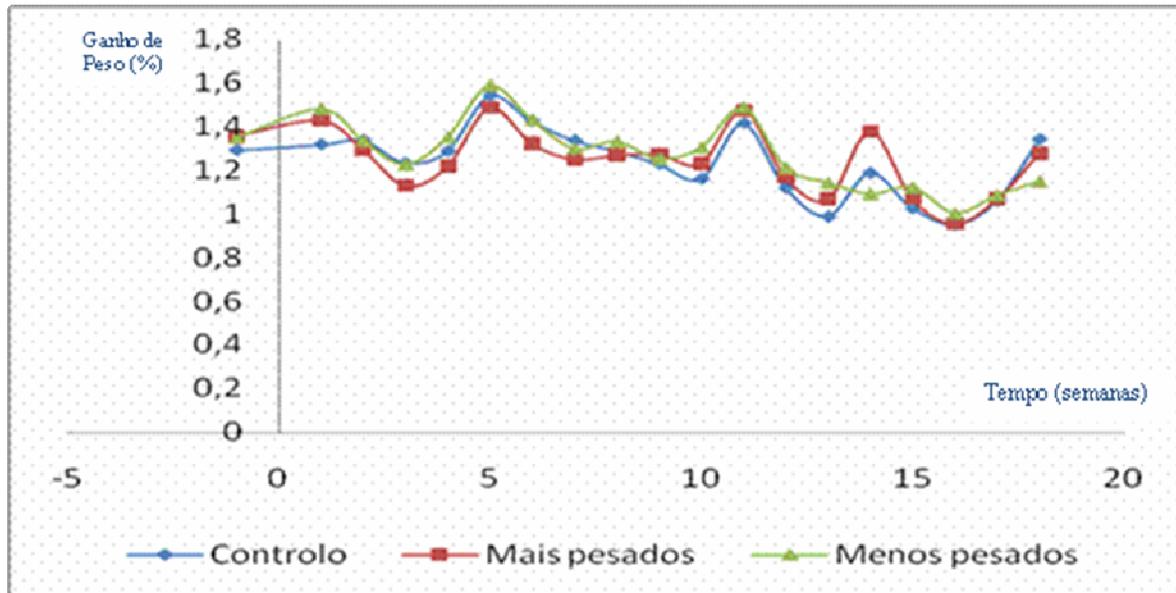


Figura 7. Evolução do peso corporal ao longo das dezoito semanas de ensaio. Pela análise do gráfico é possível observar a tendência evolutiva do peso dos animais em gramas.

3.2 Consumo de alimentos

Quando se compara o consumo de alimentos, tendo em conta o consumo total em gramas, constata-se que existem diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo que ingeriu a ração hiperlipídica, apresentando o grupo controlo um consumo mais elevado em relação ao grupo tratamento (Tabela III, Figura 8A, Anexo II e III).

Quando se analisa o consumo em termos de calorias ingeridas, também se verificam aqui diferenças significativas entre os grupos. Com efeito, o subgrupo de tratamento mais pesado tem um consumo de calorias mais elevado quando comparado com o grupo controlo (Tabela III, Figura 8B e Anexo IV).

Tendo em conta a diferença de peso entre os animais, e uma vez que a ingestão calórica está grandemente correlacionada com o peso metabólico do animal [peso metabólico = (peso em g)^{0,75}], corrigiram-se os valores do consumo, em gramas e em calorias, para o peso metabólico verificando-se assim que já não se existem diferenças significativas no consumo calórico entre os dois grupos (Tabela III e Figura 8C).

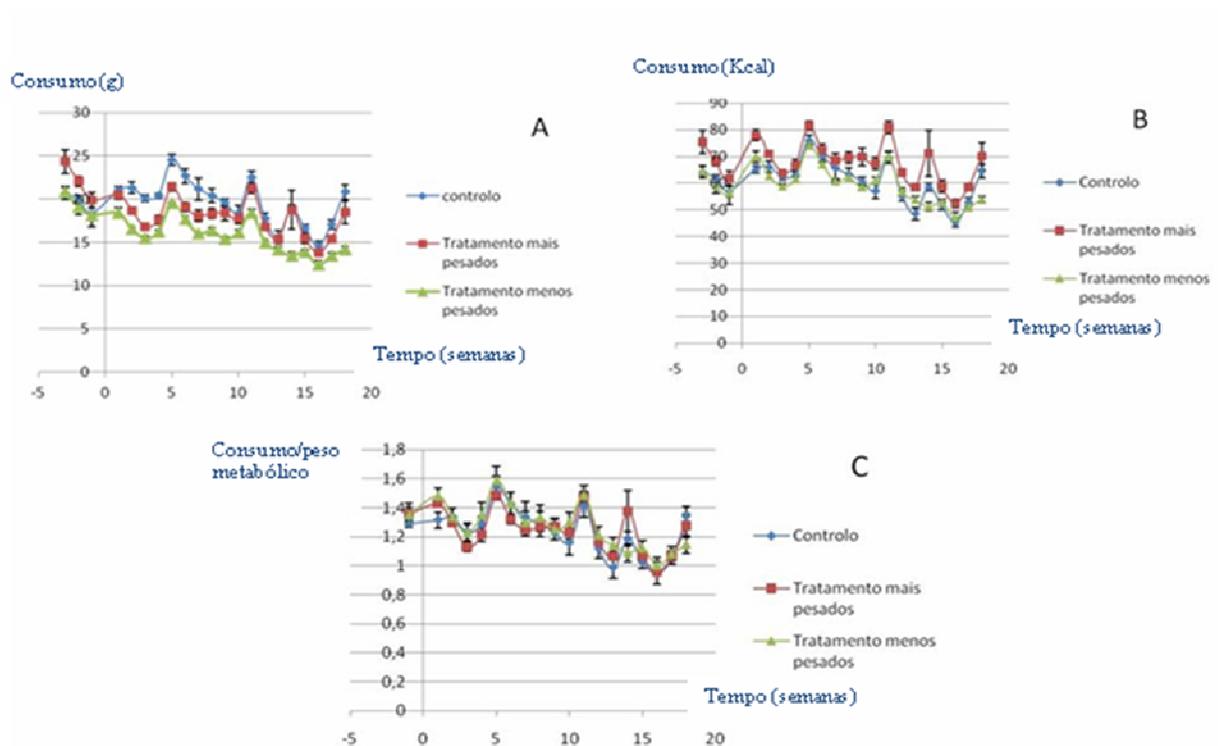


Figura 8. Evolução do consumo de ração ao longo das dezoito semanas do ensaio. A figura 8A mostra o consumo de ração pelos animais em gramas; a figura 8B mostra o consumo calórico (Kcal) dos três grupos de animais ao longo do ensaio; a figura 8C mostra o consumo calórico nos três grupos de animais corrigido para o peso metabólico.

3.3 Níveis de glucose, leptina e insulina

3.3.1 Níveis de glucose no sangue

Em termos gerais, os níveis de glicemia não apresentam diferenças significativas entre os dois grupos, apresentando uma evolução semelhante ao longo de todas as fases do ensaio em que foi efectuada a medição. Este padrão mantém-se aquando da medição três meses após o início do ensaio e no final do ensaio (Tabela IV).

Tabela IV: Níveis de glucose (mg/ml) ao longo de três períodos do ensaio (média \pm erro padrão da média). Os níveis de glicemia foram medidos aos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos.

Tempo (min)	Um Mês após o ensaio					Três Meses após o ensaio					Final do ensaio				
	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120	0	30	60	90	120
Controlo	81,6 \pm 2,2 ^{Aa}	113,6 \pm 4,3 ^{Bb}	77,6 \pm 3,8 ^{Aa}	74,2 \pm 4,4 ^{Aa}	67,2 \pm 2,2 ^{Aa}	71,8 \pm 3,61 ^{Aa}	107,6 \pm 7,41 ^{Bb}	72,2 \pm 5,4 ^{Aa}	68,2 \pm 4,9 ^{Aa}	73 \pm 3,3 ^{Aa}	77,2 \pm 1,4 ^{Aa}	100,6 \pm 4,7 ^{Bb}	81,8 \pm 9,8 ^A	71,6 \pm 5,5 ^{Aa}	69,8 \pm 6,0 ^{Aa}
Tratamento	79,2 \pm 4,4 ^{Aa}	114,4 \pm 6,4 ^{Bb}	90,8 \pm 3,0 ^{Ba}	81 \pm 1,7 ^{Aa}	78 \pm 1 ^{Aa}	80,6 \pm 2,3 ^{Aa}	102 \pm 4,6 ^{Bb}	85,2 \pm 3,4 ^{Aa}	78,4 \pm 1,6 ^{Aa}	77,2 \pm 2,8 ^{Aa}	78,8 \pm 2,9 ^{Aa}	112 \pm 7,4 ^{Bb}	83,4 \pm 3,3 ^{Aa}	82,6 \pm 2,0 ^{Aa}	77,2 \pm 2,4 ^{Aa}

Letras minúsculas iguais indicam que não existem diferenças entre os valores das colunas na mesma linha (Tukey–Hsu test; $P < 0.05$). Letras maiúsculas iguais indicam que não existem diferenças entre os valores das linhas nas mesmas colunas (Tukey–Hsu test; $P < 0.05$).

Nos três períodos do ensaio em que se efectuaram as medições dos níveis de glicemia há um padrão que se mantém, verificando-se diferenças significativas quando se comparam os valores do tempo 30min com os restantes períodos de tempo (60, 90, 120 minutos). Com efeito, os níveis de glicemia aos 30min são sempre mais elevados que nos restantes períodos de tempo, voltando os níveis aos valores basais aos 60 minutos após a ingestão de glucose. Este facto verifica-se quando se comparam apenas os valores dentro do grupo individualmente e quando se comparam os valores entre o grupo controlo e tratamento (Tabela IV).

Após a análise dos resultados, verifica-se que os animais não apresentam diferenças nem nos níveis de glucose em jejum, nem na evolução destes após a ingestão de glucose, como se pode observar na figura 9.

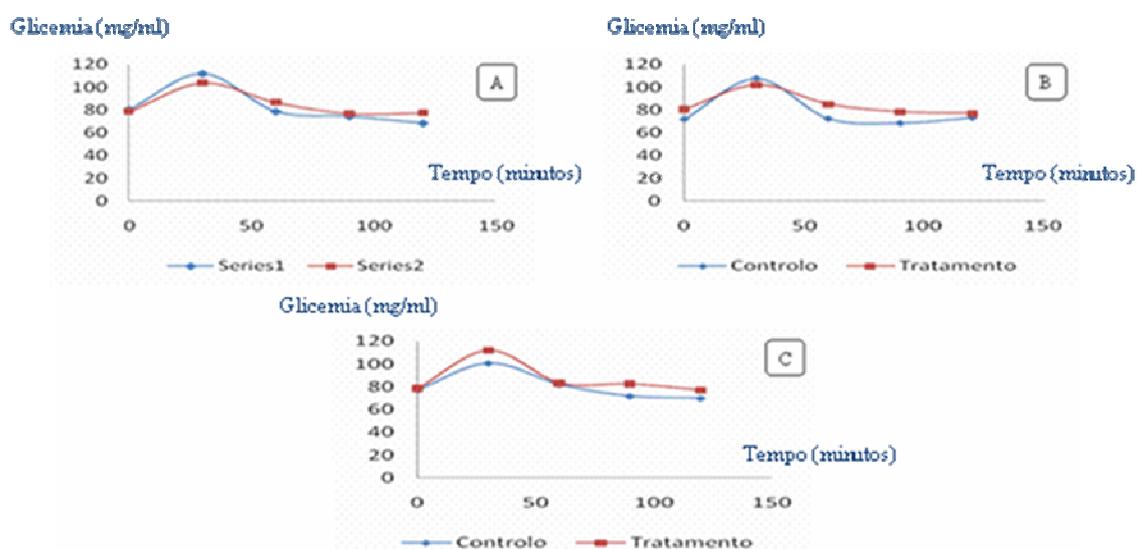


Figura 9. Evolução dos níveis de glucose nos grupos controlo e tratamento ao longo do ensaio. A, Um mês após início do ensaio (A), três meses após o início do ensaio (B) e cinco meses após o ensaio (C).

3.3.2 Níveis de insulina e leptina no plasma

Pela determinação dos níveis de leptina e de insulina, no final do ensaio experimental, verificam-se algumas diferenças nestes parâmetros entre os grupos em análise.

Relativamente aos níveis de leptina, verifica-se que estes são significativamente diferentes entre o grupo controlo e o grupo de animais mais pesados, sendo os níveis de leptina mais elevados no último grupo. Essa diferença também é significativa quando se compara o grupo de animais mais pesados com o grupo de animais menos pesados, sendo os níveis de leptina mais elevados no primeiro. Por último, ao compararmos o grupo controlo com o grupo de animais menos pesados constata-se que não existem diferenças significativas, sendo os valores de leptina no plasma muito semelhantes nestes dois grupos (Tabela III). Verifica-se uma correlação positiva moderada ($r^2 = 0,56$) entre o peso vivo dos animais e os níveis de leptina plasmáticos (Figura 10). Já no que diz respeito ao consumo da dieta hiperlipídica, se considerarmos todos os animais do grupo tratamento, não se verificam diferenças significativas entre eles (Grupo controlo: $2,5 \pm 0,4$; Grupo tratamento: $2,81 \pm 0,27$).

No que diz respeito aos níveis de insulina no plasma, é notório o facto de não existirem diferenças significativas entre os grupos de animais em estudo (Tabela III).

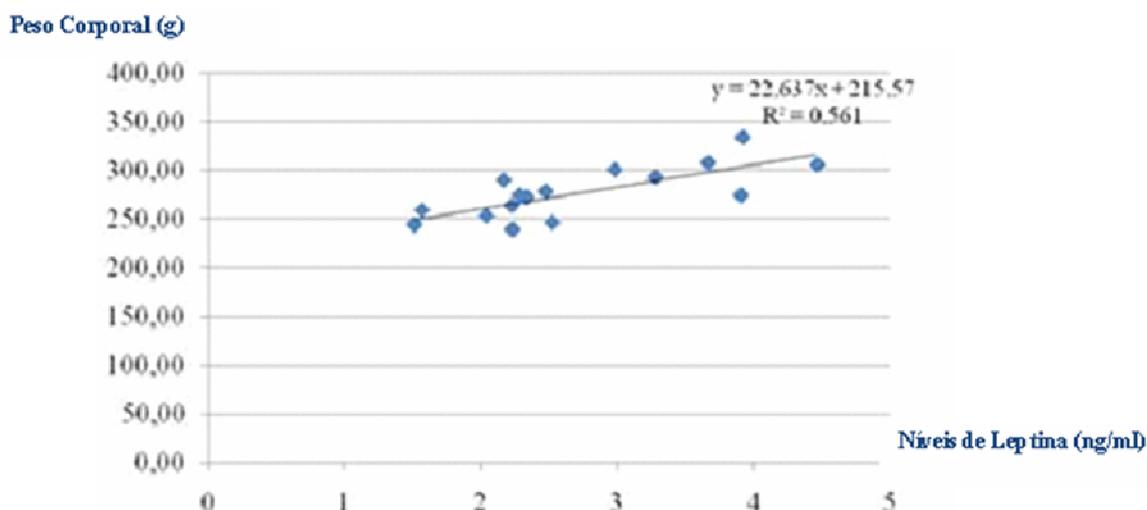


Figura 10. Correlação entre os níveis de leptina (ng/ml) no plasma e o peso corporal (g) dos animais no final do ensaio ($r^2 = 0,56$).

3.4 Concentração proteica e expressão da amilase na saliva mista

3.4.1 Concentração proteica das amostras

3.4.1.1 Comparação entre o método de Lowry e Bradford

De modo a verificar qual o método mais adequado para se usar na determinação da concentração proteica de amostras de saliva, procedeu-se à realização dos métodos de Lowry e Bradford, utilizando amostras de saliva de ratos machos, e posterior comparação dos mesmos (Tabela V).

Tabela V. Valores de concentração proteica de amostras de saliva de ratos machos determinados e comparados com dois métodos diferentes.

Amostras	Concentração Proteica ($\mu\text{g/ml}$)	
	Lowry	Bradford
A	3606,3	1143,8
B	6600,5	1921,2
C	6600	2182,7
D	3150	771,6

Apesar de, para as mesmas amostras, as concentrações proteicas terem valores diferentes com um método e outro, ambos os métodos são fiáveis para a determinação da concentração proteica de amostras de saliva pois, como se pode observar na tabela acima, as amostras mais concentradas e as menos concentradas coincidem em ambos os métodos. No entanto, para a determinação da concentração proteica das amostras no presente estudo foi utilizado o método de Bradford, uma vez que este método é mais rápido, menos complexo de realizar, menos dispendioso em termos de reagentes e apresenta maior sensibilidade em comparação com o método de Lowry (Zaia *et al.*, 1998). O método de Lowry apresenta como desvantagens o facto de ter um longo tempo de análise, possuir absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e seguir a lei de Beer-Lambert apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas (Zaia *et al.*, 1998). Além disso, o método de Bradford tem ainda como vantagem o facto de ter pouca interferência com outros reagentes laboratoriais, o que não acontece no método de Lowry, uma vez que este é muito susceptível à interferência de muitas substâncias e produtos químicos (Zaia *et al.*, 1998).

3.4.2 Comparação entre as concentrações em proteínas total da saliva

Ao analisarmos as diferentes concentrações proteicas da saliva recolhida em diferentes fases do ensaio verifica-se que não existem diferenças significativas entre o grupo controlo e os dois grupos de animais sujeitos a uma dieta rica em gordura, dentro da mesma recolha e entre recolhas diferentes. Além disso, também cada um dos grupos em estudo não apresentam diferenças individuais significativas na concentração proteica ao longo das diferentes recolhas que foram efectuadas (Tabela VI, Anexo V).

Tabela VI. Concentração proteica da saliva nos três grupos de animais em estudo ao longo de diferentes recolhas no ensaio (média \pm erro padrão da média).

Recolha	Controlo	Mais pesados	Menos pesados
Antes da dieta hiperlipídica	1094 \pm 471,0 ^{A,a}	1069,2 \pm 259,7 ^{Ba}	1163,9 \pm 603,7 ^{C,a}
Um mês após dieta hiperlipídica	7319,7 \pm 5379,2 ^{A,a}	738,8 \pm 94,0 ^{Ba}	768,5 \pm 136,3 ^{C,a}
Dois meses após dieta hiperlipídica	2679,0 \pm 1257,6 ^{A,a}	6260,3 \pm 5137,7 ^{B,a}	9153,8 \pm 4169,9 ^{C,a}
Quatro meses após dieta hiperlipídica	1764,4 \pm 741,4 ^{A,a}	1756,0 \pm 629,4 ^{B,a}	*
Cinco meses após dieta hiperlipídica	805,7 \pm 113,2 ^{A,a}	911,9 \pm 235,9 ^{B,a}	583,0 \pm 112,7 ^{C,a}

Letras minúsculas dizem respeito à comparação entre as concentrações proteicas dos três grupos de animais dentro da mesma recolha (Tukey-Hsu test; $P < 0.05$). Letras maiúsculas dizem respeito à comparação entre as concentrações proteicas de cada grupo individual ao longo das diferentes recolhas do ensaio (Tukey-Hsu test; $P < 0.05$). * Não foram efectuadas recolhas nessa fase do ensaio.

3.5 Western Blot para a proteína α -amilase

Foi efectuada a imunomarcção através de Western Blot para identificar a presença e analisar a intensidade da expresso da proteina com massa molecular de, aproximadamente, 53 KDa na saliva mista dos animais ao longo do período de ensaio. Com esta técnica confirma-se, através da utilizao do anticorpo, que a proteina em causa é a α -amilase. A imunomarcção foi efectuada antes de os animais comecarem a ingerir ração hiperlipídica, ao fim de um e três meses após a ingestão da mesma e no final do ensaio. Para todas as recolhas de saliva em que esta técnica foi aplicada, quase todas as amostras apresentaram um resultado positivo relativamente á presença da proteina α -amilase.

Após a análise estatística dos resultados constata-se que não existem diferenças significativas quando comparamos a intensidade da expresso da banda da amilase entre o grupo controlo e o grupo de animais que ingeriu a ração rica em gordura, sendo que este resultado se mantém em todas as fases do ensaio em que foram feitas as recolhas de saliva (Figura 11).

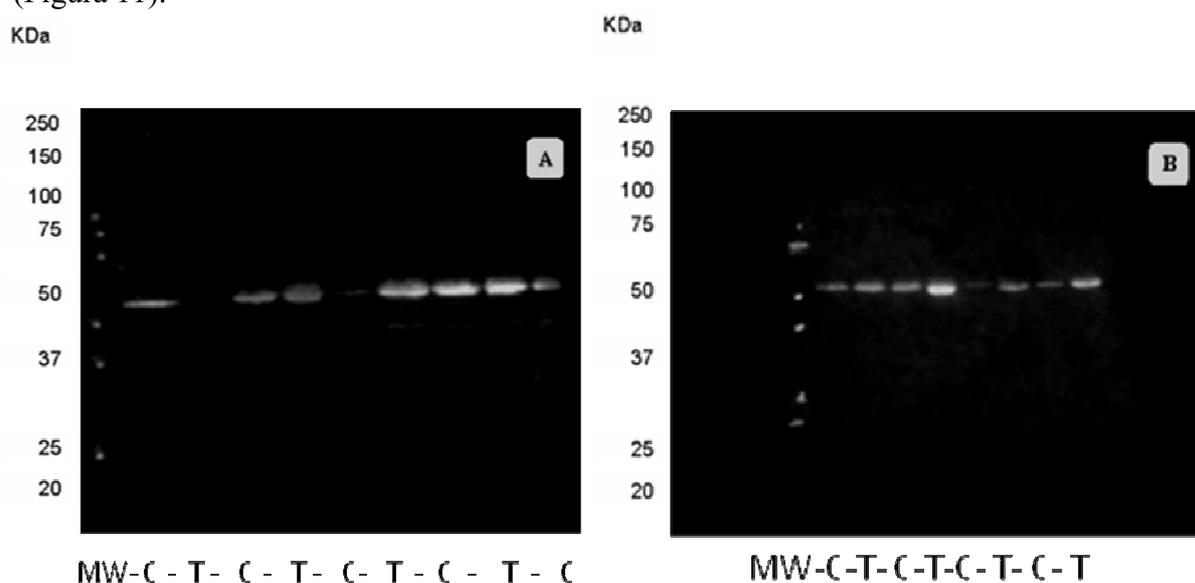


Figura 11. Western Blotting evidenciando a presença da proteina α -amilase nas diferentes amostras de saliva. As amostras representadas pela letra C dizem respeito às amostras de saliva do grupo controlo; enquanto as amostras representadas pela letra T são referentes às amostras de saliva dos animais que ingeriram ração hiperlipídica. O marcador de peso molecular (MW) está representado do lado esquerdo da imagem. A figura 11A é relativa às amostras de saliva recolhidas no início do ensaio; a figura 11B é relativa às amostras de saliva recolhidas três meses após os animais estarem a ingerir ração rica em gordura, mais precisamente, à recolha do dia 08/04/2011.

É importante referir que estes resultados devem ser analisados com algumas reservas, uma vez que aqui não estamos a marcar imunohistoquimicamente nenhuma proteína acerca da qual se tem a certeza de estar sempre presente na saliva e que existe sempre na mesma concentração, independentemente da variabilidade associada ao facto de serem vários animais diferentes em estudo. A marcação destas proteínas funciona como um “controlo positivo”, de modo a ter-se a certeza de que a quantidade de proteína presente em cada lane do gel é a mesma.

3.6 Perfil proteico salivar

Durante o tempo de duração do ensaio foram efectuadas várias recolhas de saliva aos animais, sendo que um dos objectivos dessas recolhas era o de verificar e comparar a expressão da proteína α -amilase entre os dois grupos de animais. Com efeito, após a análise, com o auxílio do software TotalLab Quant (Anexo X), da % da banda correspondente a esta proteína, entre o grupo controlo e o grupo de animais sujeitos à dieta rica em gordura (anexo VII), não se encontram diferenças significativas entre os mesmos. Essa ausência de diferenças constata-se logo no início do ensaio (figura 12, Anexo VI) e no final do mesmo (figura 13, Anexo VI). Observa-se ainda alguma variabilidade inter-individual para os níveis de amilase.

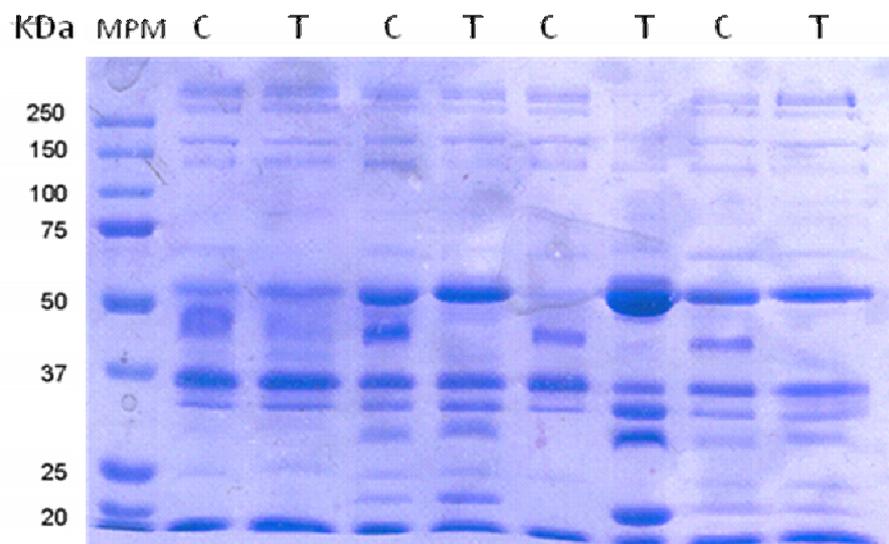


Figura 12. SDS-PAGE das proteínas salivares de ratos fêmeas Wistar. A letra C refere-se aos animais pertencentes ao grupo controlo, enquanto a letra T refere-se a animais pertencentes ao grupo em tratamento. Este gel é representativo das recolhas antes da administração da dieta rica em gordura. O marcador de massas moleculares encontra-se representado à esquerda (KDa).

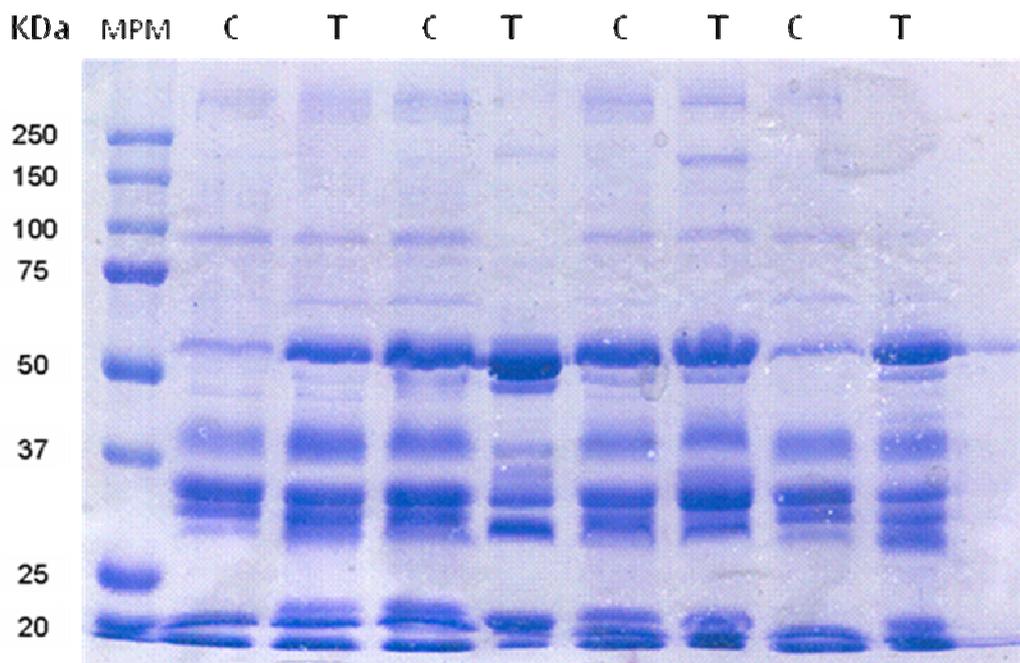


Figura 13: SDS-PAGE das proteínas salivares de ratos fêmeas Wistar. A letra C refere-se aos animais pertencentes ao grupo controlo, enquanto a letra T refere-se a animais pertencentes ao grupo em tratamento. Este gel é representativo das recolhas após a administração da dieta rica em gordura. O marcador de massas moleculares encontra-se representado à esquerda (KDa).

3.7 Glândulas salivares

3.7.1 Análise histomorfométrica

As dimensões das estruturas acinares das glândulas salivares submandibular, parótida e sublingual nos diferentes grupos do ensaio estão representadas na Tabela VII. Nas três glândulas em estudo existem diferenças significativas ($P < 0,05$), tanto na área como no perímetro dos ácinos.

Tabela VII. Áreas e perímetros (pixéis) dos ácinos de diferentes glândulas salivares dos ratos pertencentes aos três grupos analisados (média \pm erro padrão da média)

Glândulas Salivares	Controlo		Mais pesados		Menos pesados	
	Área	Perímetro	Área	Perímetro	Área	Perímetro
Submandibular	5807,1 \pm 67,4 ^a	306,9 \pm 1,9 ^A	5626,3 \pm 54,5 ^a	304,8 \pm 1,6 ^A	6072,1 \pm 65,3 ^b	314,7 \pm 1,8 ^B
Parótida	12916,7 \pm 154,9 ^{a,b}	459,3 \pm 2,9 ^A	12737,2 \pm 139,3 ^a	453,7 \pm 2,6 ^A	12366,4 \pm 134,0 ^b	444,8 \pm 2,5 ^B
Sublingual	11610,4 \pm 126,5 ^a	429,0 \pm 2,6 ^A	10570,2 \pm 99,0 ^b	409,1 \pm 2,1 ^B	10817,2 \pm 88,0 ^b	413,6 \pm 1,9 ^B

Letras minúsculas dizem respeito à comparação entre as áreas dos vários indivíduos dos diferentes grupos; letras maiúsculas dizem respeito à comparação entre os perímetros dos vários indivíduos dos diferentes grupos (Tukey–Hsu test; $P < 0,05$).

Tendo em conta a área e o perímetro da glândula submandibular, verificam-se diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo de tratamento com menos peso, e entre o grupo de tratamento com mais peso com o de menos peso (Tabela VII), não se observando diferenças entre o grupo controlo e o grupo de tratamento com mais peso. Com efeito, tanto a área como o perímetro dos ácinos dos animais do grupo com menos peso são maiores que os do grupo controlo e que os do grupo de tratamento com mais peso.

Considerando a área da glândula parótida verificam-se diferenças significativas apenas entre o grupo de animais sujeitos à dieta hiperlipídica com mais peso e os que têm menos peso (tabela VII), apresentando os animais menos pesados menores dimensões dos ácinos. Apesar de não se observarem diferenças significativas entre as áreas dos grupo controlos e tratamento, tendo em conta o perímetro da glândula parótida observam-se diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo de animais do tratamento com menos peso, e

entre os grupos do tratamento com mais peso e menos peso (tabela VII), sendo que é o grupo dos animais menos pesados aquele onde os animais apresentam ácinos de menor perímetro.

Por fim, analisando a área e o perímetro da glândula sublingual, constatam-se diferenças significativas entre o grupo controle e os dois subgrupos sujeitos à ração hiperlipídica, sendo que estes dois subgrupos não apresentam diferenças entre si (Tabela VII). Com efeito, tanto a área como o perímetro dos ácinos dos animais do grupo controle são maiores que os animais do grupo tratamento.

3.7.1.1 Presença de lipídios nas glândulas salivares

Após a observação microscópica das glândulas salivares é notória a presença de gotículas de lipídios nas glândulas parótida e submandibular, sendo estes inexistentes na sublingual. Quando se compara a glândula parótida com a submandibular verifica-se que a presença de lipídios é muito mais intensa na submandibular (figura 14, Anexo VIII). Na parótida o grupo controle e o grupo de tratamento apresentam uma quantidade de gotículas de lipídios muito semelhante (figura 14, Anexo VIII).

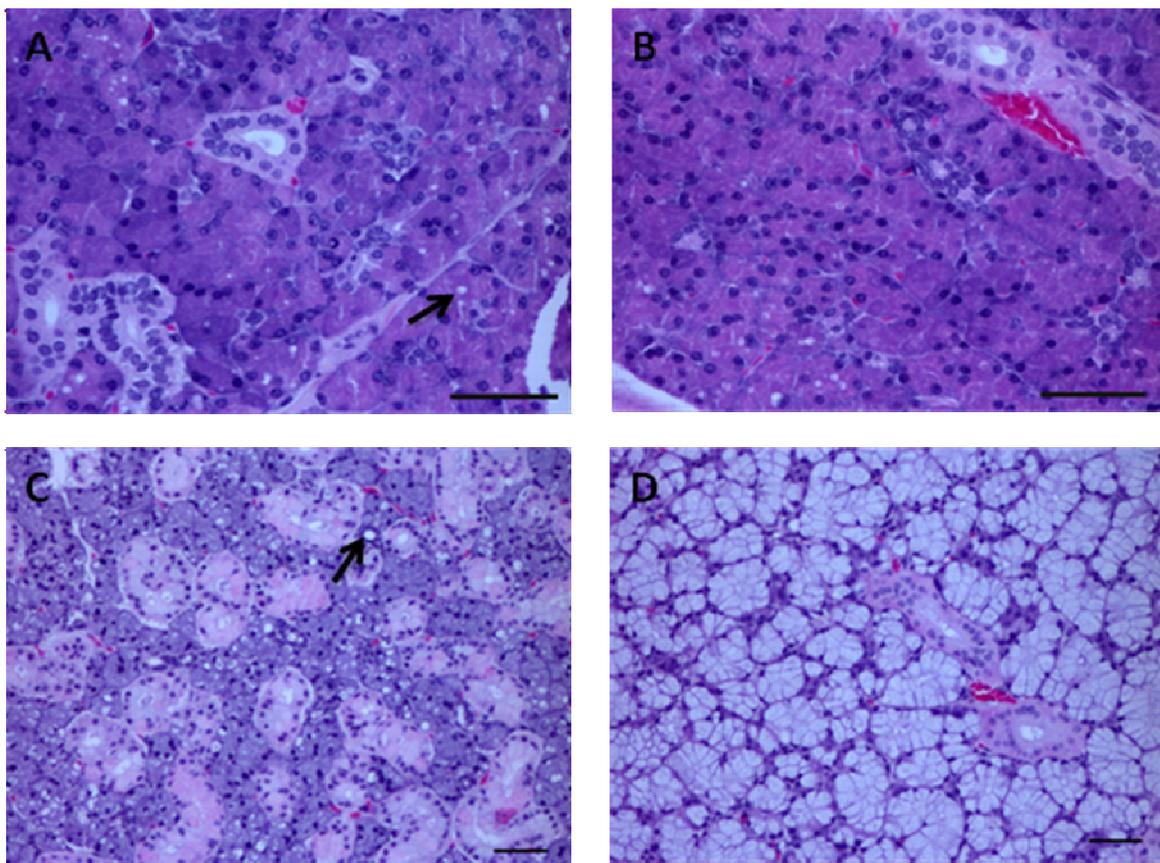


Figura 14. Imagens relativas à presença de gotículas de lipídios (seta) nas glândulas parótida (A, B; 200X, Barra = 50 μ m) e submandibular (C; 100X, Barra = 50 μ m) e ausência dos mesmos na glândula sublingual (D; 100X, Barra = 50 μ m). H&E.

Os lípidos encontram-se principalmente nos ácinos das glândulas, sendo que apenas na submandibular se verificam algumas gotículas de lípidos nos ductos.

3.7.2 Imunohistoquímica

3.7.2.1 Amilase salivar

A marcação imunohistoquímica para a proteína α -amilase nas glândulas salivares maiores indica-nos que, pelo menos aparentemente, não se verificam diferenças, na expressão da amilase entre o grupo controlo e o grupo de animais que ingeriu a ração hiperlipídica. (Tabela VIII e Figura 15).

Tabela VIII. Imunomarcação para a α -amilase nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores¹

Glândula	Estrutura	Controlo	Tratamento
Parótida	Ácinos	+++	+++
	Ductos estriados	±	±
Submandibular	Ácinos	-	-
	Ductos granulares	++	++
	Ductos estriados	±	±
Sublingual	Ácinos mucosos	-	-
	Ductos estriados	+	+
	Meias luas serosas	++	++

¹ Imunomarcação: - = negativo; ± = ocasional, focal; + = fraca; ++ = moderada; +++ = intensa.

Pela observação das imagens da figura 15 é notório o facto de que é na glândula parótida onde a expressão da amilase é mais intensa, mais especificamente no citoplasma das células acinares, em comparação com as glândulas submandibular e sublingual. Nos ductos da glândula parótida a expressão é quase inexistente.

Na glândula submandibular a expressão da amilase verifica-se apenas nos ductos, sendo mais intensa nos ductos granulares do que nos estriados (figura 15). Quanto á glândula sublingual, a expressão da amilase também não se verifica nos ácinos, mas sim nas meias luas serosas dos mesmos (figura 15), onde a intensidade da expressão é moderada, e nos ductos, onde a intensidade é fraca. (tabela VIII).

Importa referir que, como não se verificaram diferenças entre os animais do grupo de tratamento, não faz sentido distinguir, na tabela VIII, esse mesmo grupo nos subgrupos de animais mais pesados e menos pesados.

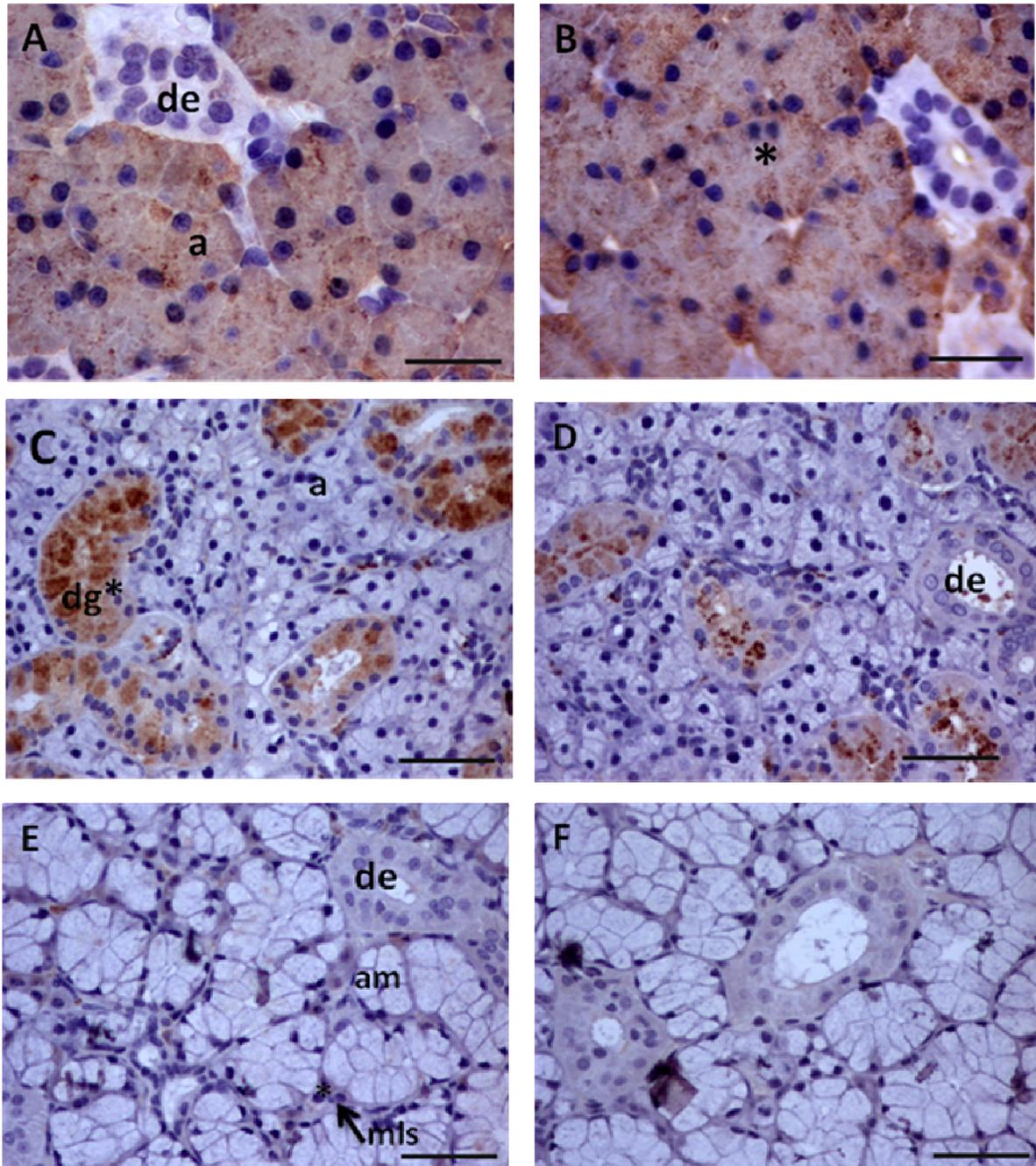


Figura 15. Imunomarcção para a α -amilase, evidenciada pela cor castanha (*), nas glândulas salivares maiores. **A** (parótida controlo); **B** (parótida tratamento); **C** (submandibular controlo); **D** (submandibular tratamento); **E** (sublingual controlo); **F** (sublingual tratamento). a- ácino; am- ácino mucoso; dg- ducto granular; de- ductos estriados; mls- meias luas serosas [200X, Barra = 50 μ m. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer]

3.7.2.2 Receptores de leptina (Ob-R)

Todas as amostras têm marcação para o anticorpo anti-lepR (Ob-R), indicando que o receptor funcional de leptina está presente em todas as glândulas salivares maiores, variando a intensidade da sua expressão consoante o tipo de glândula e a estrutura da glândula onde se encontra (Tabela IX, figura 16).

Tabela IX. Imunomarcação para o receptor da leptina (Ob-R) nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores¹

Glândula	Estrutura	Controlo	Tratamento
Parótida	Ácidos	-	-
	Ductos intralobulares	+	+
Submandibular	Ácidos	-	-
	Ductos granulares	+++	+++
	Ductos estriados	++	++
Sublingual	Ácidos	-	-
	Ductos intralobulares	+	+

¹ Imunomarcação: - = negativo; ± = ocasional, focal; + = fraca; ++ = moderada; +++ = intensa.

Com efeito, a expressão do receptor da leptina verifica-se apenas nos ductos intralobulares das glândulas, sendo inexistente nas células acinares das mesmas. Além disso, constata-se que a expressão é mais intensa nos ductos intralobulares da submandibular, nomeadamente nos ductos granulares, sendo a expressão mais fraca nos ductos das glândulas sublingual e parótida.

Quando se compara o grupo controlo com o grupo de animais sujeitos a uma dieta rica em gordura não se encontram diferenças significativas em termos de expressão de receptores de leptina, como se pode observar na tabela IX e na figura 16.

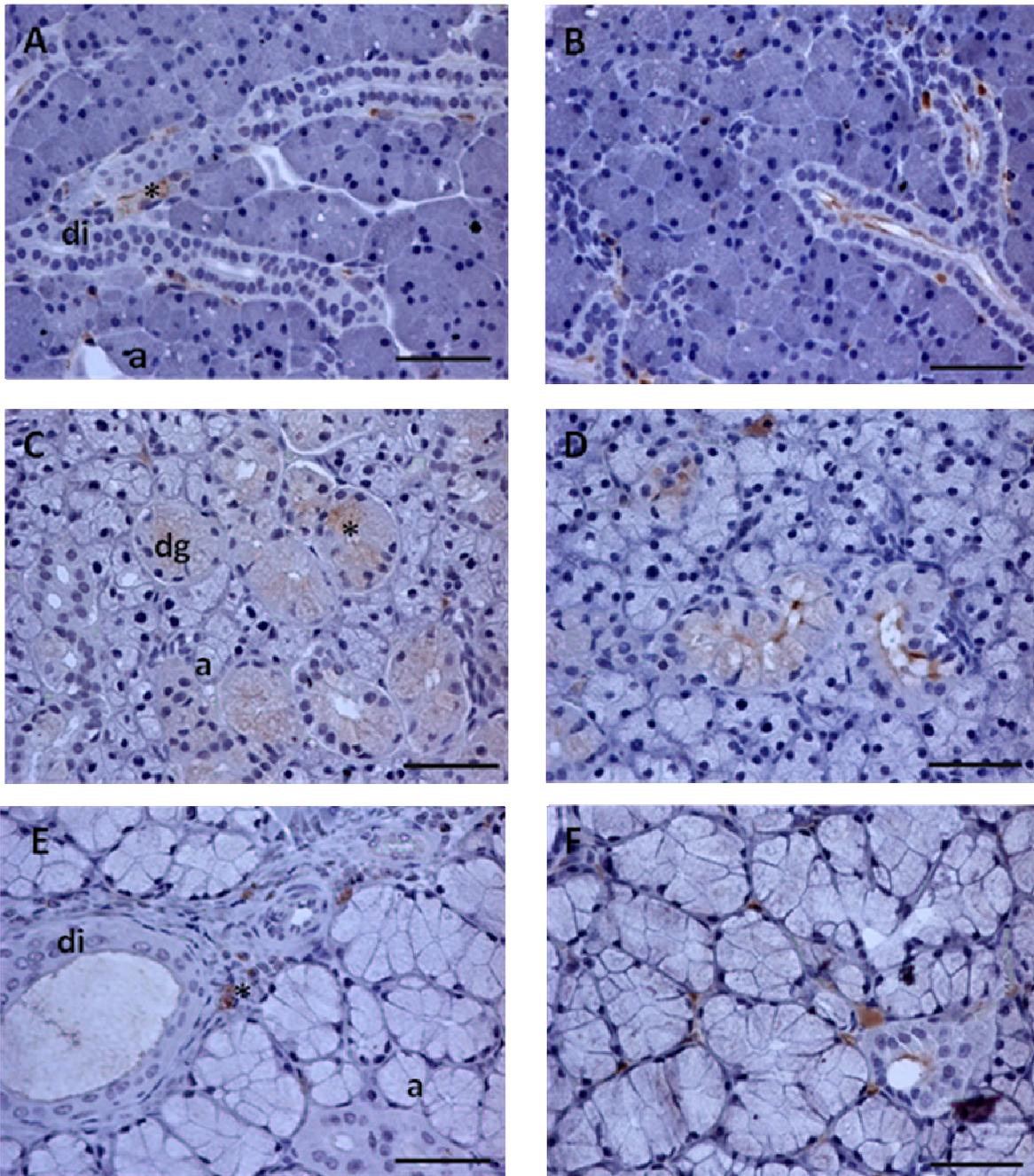


Figura 16. Imunomarcção para o receptor da leptina Ob-R, evidenciada pela cor castanha (*), nas glândulas salivares maiores. **A** (parótida controlo); **B** (parótida tratamento); **C** (submandibular controlo); **D** (submandibular tratamento); **E** (sublingual controlo); **F** (sublingual tratamento). a-ácino; di- ducto intralobular; dg- ducto granular [200X, Barra = 50 µm. Contracoloração com Hematoxilina de Meyer].

4. DISCUSSÃO

Existem muitos estudos cujo objectivo principal é verificar os efeitos que uma dieta rica em gordura tem no metabolismo de roedores. Neste trabalho, ratos fêmeas wistar foram sujeitos a uma dieta rica em gordura durante dezoito semanas. Ao fim desse período de ensaio a percentagem de ganho de peso nos ratos sujeitos à dieta hiperlipídica não apresentou diferenças significativas em comparação com o grupo controlo, destacando-se aqui apenas o facto de, no grupo tratamento, haver um sub-grupo de animais para os quais se observou tendência para um maior ganho de peso, ainda que não o suficiente para diferirem significativamente do controlo. De modo semelhante ao que aconteceu com a percentagem de ganho de peso corporal, também o consumo calórico não apresentou diferenças significativas entre o grupo controlo e tratamento. Estes resultados obtidos afastam-se um pouco da maioria dos resultados encontrados na bibliografia, em que a ingestão de uma dieta rica em gordura reflecte um aumento de peso corporal e uma maior ingestão calórica.

A proposta de uma dieta experimental deve ter em consideração não só a quantidade de calorias, mas também as suas características físicas e de palatibilidade (Cabeço *et al.*, 2010). Existem evidências de que as propriedades físicas da dieta podem influenciar o consumo de alimentos. As dietas experimentais mais frequentemente utilizadas para provocar a obesidade são formuladas com o acréscimo de constituintes energéticos, entre os quais lípidos, à ração padrão. Entre esses constituintes estão o amendoim, leite condensado, biscoito tipo *wafers*, óleo e chocolate (Cabeço *et al.*, 2010). Cabeço *et al.* (2010) induziram a obesidade em ratos Wistar machos, tendo obtido como resultados o desenvolvimento de animais propensos à obesidade e animais resistentes à obesidade, havendo aqui diferenças significativas no ganho de peso e na quantidade de gorduras totais entre estes dois grupos e o grupo controlo. Neste estudo, a dieta a que os animais foram submetidos foi obtida misturando-se leite condensado, amendoim, farinha de soja, óleo de milho, ração Bio Tec e bolacha *wafers* de chocolate. Esta dieta fornecia 5,31 Kcal/g, 22,3% gordura, 22,2% proteína, 15,9% fibra e 35,7% carboidratos.

Tal como foi referido anteriormente, os animais sujeitos a uma dieta rica em gordura não apresentaram, no nosso trabalho, diferenças significativas em termos de ganho de peso e de consumo calórico em relação ao grupo controlo. Um dos factos que pode ter contribuído para este resultado é a composição da ração que foi dada aos animais em tratamento, em que a

ração *standard* foi embebida em óleo de girassol (Anexo IX), não havendo mistura de outros componentes referidos como palatáveis, tal como o amendoim, a farinha de soja ou o chocolate. Desta forma, a ração fornecida aos animais pode não ter apresentado uma palatabilidade muito aumentada em relação à palatabilidade da ração fornecida ao grupo controlo. Isto pode ter contribuído para que os animais regulassem a ingestão consumindo apenas o suficiente para manter as suas necessidades metabólicas. Se compararmos a dieta hiperlipídica utilizada neste estudo com a dieta referida no estudo de Cabaço *et al.* (2010), verifica-se que esta última fornecia uma maior quantidade de calorias em comparação com a fornecida pela dieta administrada no presente estudo, o que pode ter contribuído para uma maior acumulação de gordura observada por esses autores.

Outra possível explicação para a diferença entre os resultados obtidos e os resultados referidos por outros autores reside no facto de, no trabalho em causa, se ter utilizado ratos Wistar fêmeas em vez de machos. De facto, em quase todos os estudos presentes na bibliografia a obesidade é induzida em ratos Wistar machos, sendo conhecido que os ratos machos consomem maior quantidade de ração que as fêmeas, apresentando um maior peso corporal (Bernardi *et al.*, 2011). Inclusive, alguns estudos referem maior resistência à acção da leptina em machos do que em fêmeas, contribuindo para um maior consumo de alimento (Priego *et al.*, 2009).

Estudos realizados por Buettner *et al* (2007) evidenciaram que o tipo de óleo que faz parte da dieta hiperlipídica também influencia os efeitos que essa dieta provoca nos animais, para além da percentagem de calorias fornecida pela gordura da dieta. Dietas ricas em ácidos gordos saturados induzem um fenótipo de ganho de peso, enquanto dietas ricas em ácidos gordos monoinsaturados ou polinsaturados beneficiam a composição corporal e a acção da insulina. Este facto também pode contribuir para se tentar perceber os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que o óleo utilizado na ração é óleo de origem vegetal (óleo de girassol), contendo mais ácidos gordos polinsaturados do que grande parte das gorduras utilizadas na formulação destas dietas (Anexo IX). Se tivesse sido utilizado um óleo de origem animal, como a banha de porco, talvez se tivessem manifestado mais os sintomas da obesidade, tal como acontece no estudo efectuado por Buettner *et al* (2007), uma vez que a gordura animal é rica em ácidos gordos saturados.

Foi referido que uma dieta rica em ácidos gordos polinsaturados causa uma diminuição na acumulação de gordura corporal em ratos, ao contrário do que acontece quando a dieta é rica em ácidos gordos saturados (Zhang *et al.*, 2010). A explicação sugerida para esse facto é a de que dietas ricas em ácidos gordos polinsaturados são menos adipogénicas devido à

indução coordenada de genes de oxidação de ácidos gordos através de receptores activados por proliferadores peroxissomais (PPAR) e supressão de genes lipogénicos através de proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP) (Zhang *et al.*, 2010). Estudos realizados com um óleo rico em ácidos gordos polinsaturados (n-6-PUFA) e pobre em ácidos gordos saturados mostraram uma eficácia, por parte deste, na redução da gordura corporal em ratos Sprague-Dawley (Zhang *et al.*, 2010).

Os estudos de Zhang *et al.* (2010) evidenciaram que ratos alimentados com uma dieta em que a gordura utilizada é a banha de porco desenvolveram obesidade acentuada, hiperglicémia e hiperinsulinémia. Por outro lado, ratos alimentados com uma dieta em que a gordura foi óleo de cártamo não desenvolveram obesidade nem desordens metabólicas lipídicas. Além disso, estes autores verificaram ainda que a obesidade em ratos induzida por uma dieta rica em ácidos gordos saturados é reversível quando esses mesmos animais passam a ser alimentados com uma dieta que tenha elevados níveis de n-6 PUFAs, melhorando a tolerância à glucose, insulina e a concentração lipídica.

Além do peso e do consumo, também os níveis de leptina e de insulina, no plasma, e glucose, no sangue, foram objecto de estudo neste trabalho. Verifica-se que os níveis de leptina nos animais de tratamento mais pesados são significativamente mais elevados, em comparação com o grupo controlo e com o grupo de animais de tratamento menos pesados, resultado que vai ao encontro do que foi publicado por Fan *et al.* (2011). Uma vez que a leptina tem como funções principais regular a ingestão e o dispêndio de energia através de mecanismos neuronais e endócrinos, mediados pelo receptor de leptina e pelos reguladores da saciedade (NPY, POMC), será lógico pensarmos que uma concentração elevada de leptina circulante nos animais com peso corporal mais elevado pode contribuir para uma sensação de saciedade. Verifica-se aqui que os níveis de leptina estão relacionados com o peso final do animal, o que faz sentido se tivermos em conta o facto de a leptina ser produzida maioritariamente pelos adipócitos (Burman *et al.*, 2009).

Quando se comparam os grupos para os níveis de insulina no sangue, constata-se que não existem aqui diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo de animais sujeitos a uma dieta rica em gordura. Resultados semelhantes podem ser observados quando comparamos os níveis de glicemia entre os animais do grupo controlo e do grupo que ingeriu a ração hiperlipídica, não se observando diferenças significativas entre os dois grupos em nenhuma das determinações feitas ao longo do ensaio (ao fim do 1º, 3º e 4º mês de administração da dieta experimental). Olhando para estes resultados, constata-se que a dieta rica em óleo de girassol, usado no presente trabalho, pode não afectar os níveis de glucose e

de insulina no sangue, o que não está de acordo com a maioria dos resultados publicados na bibliografia, que demonstram que uma dieta rica em gordura promove a hiperglicémia e a resistência à insulina (Buettner *et al.*, 2007). No entanto, há que ter em conta que estes estudos foram realizados com tipos de gordura diferentes daquele estudado por nós.

Um dos grandes objectivos deste estudo foi verificar qual o efeito que uma dieta rica em gordura, e alterações no peso corporal, provocam na concentração proteica da saliva, estando o trabalho focado nas alterações ao nível da proteína α -amilase. Com efeito, quando se analisa os resultados obtidos para a concentração proteica da saliva nas diferentes recolhas efectuadas ao longo do ensaio, constata-se que não existem diferenças significativas entre os três grupos de animais dentro da mesma recolha nem diferenças entre recolhas diferentes. Estudos realizados por Pannunzio *et al.* (2010) mostraram que a saliva de crianças obesas tem uma concentração proteica mais elevada em relação ao grupo controlo. No entanto, há que ter em conta que estes autores realizaram o estudo com humanos e neste ensaio trabalhou-se com um modelo animal, o que pode influenciar e justificar este resultado. Por outro lado, no nosso caso apenas foi possível comparar animais mais pesados com animais menos pesados, não se tendo trabalhado com animais obesos. Além disso, o facto de não existir muita informação bibliográfica acerca de alterações na concentração proteica induzidas pelo consumo de gordura também dificulta a discussão deste resultado.

Após a análise dos resultados obtidos através de técnicas como SDS-PAGE e Western Blot, verifica-se que a expressão da proteína α -amilase não se encontra alterada no grupo de animais sujeitos à dieta hiperlipídica, não havendo aqui diferenças significativas na intensidade da expressão desta proteína entre estes animais e o grupo controlo.

Estudos realizados por Gidez (1973), com ratos, demonstraram que as proporções relativas das enzimas pancreáticas, como é o caso da amilase, podem ser modificadas de acordo com o constituinte predominante da dieta. Deste modo, dietas ricas em amido provocam um aumento nos níveis de amilase, enquanto dietas ricas em gordura levam a níveis de amilase significativamente mais baixos (Gidez, 1973). Este resultado está de acordo com os resultados publicados por An *et al.* (2011), em que os níveis de amilase pancreática não foram diferentes em ratos sujeitos a uma dieta rica em gordura e a uma dieta *standard*. Tal pode estar relacionado com o facto de a enzima α -amilase ser uma enzima envolvida na digestão de carboidratos, sendo a sua actividade mais afectada por dietas ricas nestes macronutrientes (An *et al.*, 2011).

Para além da saliva, a morfologia das glândulas salivares, bem como a expressão e localização de amilase salivar, nestas estruturas, foram também avaliadas. Após dezoito

semanas de ensaio verificam-se diferenças ao nível das diferentes glândulas entre os dois grupos de animais em estudo.

Relativamente à glândula parótida verifica-se que o grupo de animais de tratamento mais pesados tem ácinos com uma área maior comparativamente com os animais de tratamento que ganharam menos peso. No entanto, já não se verificam diferenças significativas entre os animais de tratamento mais pesados e o grupo controlo. Quanto ao perímetro dos ácinos, este é menor nos animais que ganharam menos peso. No que diz respeito à glândula submandibular são os animais de tratamento menos pesados que apresentam ácinos com maior área e perímetro, comparativamente aos outros animais. Por sua vez, no que diz respeito à glândula sublingual são os animais do grupo controlo que têm ácinos com maior área e perímetro.

Estudos realizados por Dawes (1970) demonstraram que o tamanho e a actividade das glândulas salivares são determinados pelo consumo de dietas que requerem muita mastigação ou que têm uma estimulação gustativa agradável. Foi observado que ratos sujeitos a uma dieta líquida, ou sujeitos a uma redução na ingestão de alimento sólido, apresentam atrofia das glândulas salivares. Tal pode ser uma justificação para o facto de os animais do grupo controlo apresentarem ácinos de maiores dimensões nas glândulas parótida e sublingual, uma vez que este grupo de animais apresentou um consumo de ração, em gramas, mais elevado em relação aos animais do tratamento, o que significa maior actividade mastigatória, traduzindo-se no aumento dos ácinos destas glândulas salivares. Uma outra hipótese a considerar é a de que os animais com níveis mais elevados de leptina, como são os animais mais pesados, tenham associada uma maior actividade do sistema nervoso simpático, o qual, por sua vez, está associado a uma hipertrofia das glândulas salivares parótidas (Henriksson *et al.*, 1985). No entanto, com os dados recolhidos, esta é apenas uma hipótese, sendo necessários mais estudos para a testar e confirmar.

Estudos realizados por Pisiriciler *et al* (2009) mostram que a hiperlipidémia leva a uma acumulação de lípidos, de severa a moderada, nas glândulas salivares maiores. No trabalho em causa, após a observação microscópica das glândulas salivares, verifica-se a presença de gotículas de lípidos nas glândulas parótida e submandibular, sendo estes inexistentes na sublingual. No entanto, verifica-se que a presença de lípidos é mais intensa na glândula submandibular que na parótida, o que não está de acordo com os resultados obtidos por Pisiriciler *et al* (2009), os quais indicam que na glândula submandibular é onde se verifica uma maior resistência à acumulação de lípidos. Quando comparamos a presença de lípidos nas glândulas salivares dos animais do grupo controlo com os animais sujeitos à dieta rica em

gordura, verifica-se que não há diferenças significativas entre ambos. O facto de não haver diferenças significativas entre o grupo controlo e tratamento, mais uma vez, pode ter a ver com o facto de não termos trabalhado com animais obesos, ou ter a ver com o tipo de gordura utilizada. Estudos realizados por Daskala *et al* (2011) revelam que uma dieta hiperlipídica leva a um aumento do número de lípidos no soro, o que pode ser responsável pelo inchaço da glândula parótida.

Após avaliação da expressão de α -amilase na saliva, no presente trabalho experimental, analisou-se a intensidade da expressão da enzima amilase nas glândulas salivares maiores e verificou-se que, apesar de se verificar a presença desta enzima em todas as glândulas, é na glândula parótida onde essa expressão é mais intensa, mais precisamente nas células acinares. Estudos recentes analisaram o perfil de expressão genética das três glândulas e verificou-se que o da submandibular e sublingual é muito semelhante, enquanto o da parótida é consideravelmente diferente. Deste modo, apesar de os genes que codificam enzimas salivares serem altamente expressos em todas as glândulas salivares, os que codificam a amilase são expressos predominantemente na parótida (Tamoko *et al.*, 2010). A amilase salivar é secretada principalmente pelas células serosas da parótida. Essa secreção é desencadeada, sobretudo, em resposta a estímulos relacionados com a ingestão de alimento, os quais levam à secreção de outras hormonas (ex melatonina) que provocam a secreção da amilase (Cevik-Aras *et al.*, 2011).

Tal como foi referido anteriormente, apesar de ser na glândula parótida onde a expressão de amilase é mais intensa, esta também se verifica, embora com uma intensidade muito menor, nos ductos das glândulas sublingual e submandibular, sendo mais evidente nos ductos granulares da submandibular. A presença de amilase neste tipo de ductos pode estar relacionada com o facto de estas estruturas terem a particularidade de ter uma actividade de síntese e secreção de proteína mais intensa que outros tipos de ductos. Para além disso, as células dos ductos têm a capacidade de realizar alguma endocitose de proteínas e é possível que alguma da amilase aí presente possa resultar desse processo (Harris *et al.*, 1998; Hand *et al.*, 1987).

Além de verificar a intensidade da expressão da amilase nas glândulas salivares, neste estudo comparou-se a expressão desta enzima nas glândulas de animais controlo e sujeitos a uma dieta rica em gordura, chegando-se à conclusão que não existem diferenças na intensidade da expressão da amilase entre os dois grupos. Estes resultados vão de encontro à ausência de diferenças encontradas para a amilase secretada na saliva. Tal pode estar relacionado com o facto de a amilase salivar ser uma enzima envolvida principalmente na

digestão de carboidratos e não ser influenciada pelo aumento de gordura na dieta, que é o que se encontra manipulado neste trabalho (An *et al.*, 2011). Deste modo, pode-se constatar que uma dieta hiperlipídica não altera a expressão da amilase nas glândulas salivares, tal como já tinha sido referido, aquando da observação do perfil proteico, ou seja, que uma dieta desta natureza não tem efeitos na expressão desta proteína na saliva mista.

Além da amilase, também a presença de receptores de leptina nas glândulas salivares foi objecto de estudo deste trabalho. A leptina é produzida principalmente pelo tecido adiposo, sendo que o tecido adiposo presente no parênquima das glândulas salivares tem um papel activo na regulação da expressão da leptina salivar (Matteis *et al.*, 2002). Estudos realizados por Matteis *et al.* (2002) em ratos e humanos demonstraram que as glândulas salivares maiores produzem leptina. Tal facto leva à hipótese de que os péptidos, como a leptina, são armazenados dentro de células glandulares antes de serem libertados na saliva (Bohlender *et al.*, 2003). A detecção de leptina na saliva sugere que esta é um produto de secreção exócrina (Matteis *et al.*, 2002).

A leptina, tal como a maioria das hormonas, actua mediante a sua ligação a receptores específicos, Ob-R (Shánchez *et al.*, 2005). A imunocoloração para os receptores de leptina mostrou que estes se encontram nas membranas de células glandulares (Bohlender *et al.*, 2003). Neste trabalho, comparou-se a expressão dos receptores de leptina entre os diferentes grupos experimentais, não se tendo observado diferenças. Observou-se a presença desses receptores nas glândulas salivares maiores, tanto de animais do grupo controlo, como de animais sujeitos a uma dieta rica em gordura, sendo a sua expressão mais intensa nos ductos granulares da glândula submandibular e inexistente nas células acinares das três glândulas salivares maiores. A observação de receptores de leptina nas glândulas salivares é importante no presente trabalho, na medida em que estudámos animais com níveis de leptina diferentes. A presença destes receptores sugere uma possível acção directa da leptina a nível destas glândulas. Assim, e mesmo sem termos observado diferenças a nível da expressão de amilase, podemos pensar que indivíduos com níveis de leptina mais elevados possam apresentar outras diferenças na secreção salivar, para além das investigadas.

A realização deste trabalho experimental pode abrir caminho para estudos futuros que levem a uma melhor compreensão do envolvimento das alterações provocadas pelo consumo de gordura a nível das características da cavidade oral e da percepção dos alimentos.

5. Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a administração de uma dieta enriquecida em óleo de girassol não é suficiente para provocar obesidade em ratos Wistar, pelo menos para os teores utilizados no presente estudo. Estes resultados poderão ter a ver com o elevado teor de ácidos gordos mono- e polinsaturados, que este tipo de gordura apresenta.

Ao longo do período de 18 semanas, de duração do ensaio, não se observaram alterações na síntese e secreção da proteína α -amilase salivar, nem na expressão desta proteína a nível das glândulas salivares. No entanto, foram observadas diferenças no tamanho dos ácinos das glândulas salivares maiores, o que aponta para a existência de algumas alterações na função salivar em indivíduos submetidos a este regime alimentar, que poderão ter a ver com as características físicas e sensoriais da dieta, ou com alguma acção indirecta desta a nível do sistema nervoso autónomo. Por este motivo consideramos que este assunto merece ser explorado no futuro.

Estudos futuros, que ajudem a clarificar muitas das hipóteses propostas neste trabalho, poderão ser importantes para compreender como dietas ricas em gordura afectam a composição da saliva e, conseqüentemente, o meio oral e a percepção dos alimentos, o que poderá contribuir para uma melhor compreensão acerca dos factores que contribuem para a escolha da dieta.

A informação acerca da relação entre a composição proteica da saliva e a obesidade é ainda escassa, o que poderá ter a ver com a dificuldade que existe em separar completamente a obesidade de outras doenças que influenciem essa composição, como é o caso da diabetes, doença cardiovascular e hipertensão.

Deste modo, o estudo da composição da saliva de indivíduos obesos poderá ser importante para a compreensão desta patologia, bem como das suas escolhas alimentares.

6. Bibliografia

Ainslie D, Proietto J, Fam B, Thorburn A. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 71:438-42.

Almeida P, Grégio A, Machado M, Lima A, Azevedo L. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *The Journal of Contemporary Dental Practice* 2008; 9.

An M. H, Shin Y.P, Do Kyung L, Jung R.K, Min K.C, Si Won L, Hyung T.L, Kyung J.K, Nam J.H. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. In high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10:116.

Aras H.C, Ekstrom J. Cholecystokinin- and gastrin-induced protein and amylase secretion from the parotid gland of the anaesthetized rat. *Regul Pept* 2006a; 134:89– 96.

Aras H.C, Ekstrom J. Pentagastrin-induced nitric oxide-dependent protein secretion from the parotid gland of the anaesthetized rat. *Exp Physiol* 2006b; 91: 977-982.

Aras H.C, Ekstrom J. Melatonin-evoked in vivo secretion of protein and amylase from the parotid gland of the anaesthetised rat. *J Pineal Res* 2008; 45: 413-421.

Aps J.K, Martens L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into Saliva. *Forensic Sci Int.* 2005; 150: 119-31.

Bartoshuk L.M, Duffy V.B, Hayes J.E, Moskowitz H.R, Snyder D.J. Psychophysics of sweet and fat perception in obesity: problems, solutions and new perspectives. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:113–1148.

Bernardi M.M, Spinosa H.S, Ricci E.L, Reis-Silva M, Silva A.C, Dalmolin D.P. A eficácia e segurança do insumo fitoterápico PholiaNegraTM. Departamento de patologia, Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, universidade de São Paulo, 2011.

Bohlender J, Rauh M, Zenk J, Gröschl M. Differential distribution and expression of leptin and the functional leptin receptor in major salivary glands of humans. *Journal of Endocrinology* 2003; 178: 217 – 223.

Buettner R, Parhofer K.G, Woenckhaus M, Wrede C.E, Kunz-Schughart L.A, Schölmerich J, Bollheimer L.C. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology* 2006; 36: 485 – 501.

Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer L. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity* 2007; 15: 798-808.

Cabeço L, Akiba M, Calsa M, Sartori D, Vicentini-Paulino M.L, Pinheiro D. High-fat diet using soybean meal as protein source: use for selecting rats prone and resistant to obesity. *Revista de Nutrição* 2010; 23: 417-424.

Caro, J, Definitions e Classification of Obesity. Endotex 2002.

Cate T.A.R. Histologia Bucal, Desenvolvimento, Estrutura e Função, 5ª edição, 1998.

Cevik-Aras H, Godoy T, Ekstram J. Relatanin- induced protein synthesis in the rat parotid gland. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2011; 62: 95-99.

Chen K, Yan J, Suo Y, Li J, Wang Q, Lv B. Nutritional status alters saccharin intake and sweet receptor mRNA expression in rat taste buds. *Brain Res* 2010; 1325: 53– 62.

Da Costa G, Lamy E, Capela e Silva F, Andersen J, Sales Baptista E, Coelho A.V. Salivary Amylase Induction by Tannin-Enriched Diets as a Possible Countermeasure Against Tannins. *Journal of Chemical Ecology* 2008; 34:376-387.

Daskala I.D, Tesseromatis C.C. Morphological Changes of Parotid Gland in Experimental Hyperlipidemia. *International Journal of Dentistry*, 2011.

Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972; 220:529-545.

Dawes C. Effects of Diet on Salivary Secretion and Composition. *Journal of Dental Research Supplement* 1970; 49.

Dawes C. The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. *J Physiol* 1981; 320:139-148.

De La Serre C.B, Ellis C.L, Lee J, Hartman A.L, Rutledge J.C, Raybould H.E. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 2010; 299:440–G448.

De Matteis R, Puxeddu R, Riva A, Cinti S. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *Journal of Anatomy* 2002; 201:363-370.

Donaldson L.F, Bennett L, Baic S, Melichar J.K. Taste and weight: is there a link? *Am J Clin Nutr* 2009;90:800S-803S.

Douglas C.R. Tratado de Fisiologia Aplicado à Saúde, 5ª edição, 2002.

Ellis G.L, Auclair P,L, Gnepp D.R. Surgical Pathology of the Salivary Glands. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1991.

Emmelin N. Nerve interactions in salivary glands. *J Dent Res* 1987;66:509-517.

Fan C, Liu X, Shen W, Deckelbaum R, Qi K. The Regulation of Leptin, Leptin Receptor and Pro-opiomelanocortin Expression by N-3 PUFAs in Diet-Induced Obese Mice Is Not Related to the Methylation of Their Promoters. *Nutrition & Metabolism* 2001; 8:31.

Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue - an update. *Horm Metab Res* 2007; 39(5): 314-321.

Gidez L. Effect of dietary fat on pancreatic lipase levels in the rat. *Journal of Lipid Research* 1973; 14.

Glijer B, Peterfy C, Tenenhouse A. The effect of vitamin D deficiency on the secretion of saliva by rat parotid gland in vivo. *J Physiol* 1985;363:323-334.

Guebur M.I, Rapoport A, Sassi L.M, Machado R.A, Hepp V. Alterações no fluxo salivar em pacientes com carcinoma espinocelular de boca e orofaringe submetidos a radioterapia de cabeça e pescoço. *Revista In.t Estomatologia* 2004; 1: 85-90.

Hajnal A, Covasa M, Bello N. Altered taste sensitivity in obese, prediabetic OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2005; 289: 1675-1686.

Hand A.R, Coleman R, Mazariegos M.R, Lustmann J, Lotti L.V, Endocytosis of Proteins by Salivary Gland Duct Cells. *Journal of Dental Research* 1987; 66:412-419.

Harris M, Edgar M, Meghji S. Saliva: its secretion, composition and functions. *Clinical Oral Science* 1998; 179-189.

Hempelmann E, Schirmer R.H, Fritsch G, Hundt E, Gröschel-Stewart U. Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*. *Molecular Biochemistry and Parasitology* 1987; 23: 19– 24.

Henriksson R, Carlsöö B, Danielsson A, Sundström S, Jönsson G. Developmental influences of the sympathetic nervous system on rat parotid gland. *Journal of the Neurological Sciences* 1985; 71:2-3.

Hirtz C, Chevalier F, Centeno D, Ofidal, V, Egea J. C, Ossignol M, Sommerer N, Periere D. D. Characterization of multiple forms of alpha-amylase in human saliva. *Proteomics* 2005; 5:4597–4607.

Humphrey S, Williamson R. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 2001; 85: 162-169.

Inoue H, Ono K, Masuda W, Morimoto Y, Tanaka T, Yocota M, Inenaga K. Gender difference in unstimulated whole saliva flow rate and salivary gland sizes. *Arch Oral Biol* 2006;51:1055-1060.

Kawai K, Sugimoto K, Nakashima K, Miura H, Ninomiya Y. Leptin as a modulator of sweet taste sensitivities in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 11044– 11049.

Keller K.L, Tepper B.J. Inherited taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil in diet and body weight in children. *Obes Res* 2004;12:904-12.

Kershaw E.E, Flier J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89:2548–2556.

Lamy E, Baptista E.S, Coelho A.V, Capela e Silva F. Morphological alterations in salivary glands of mice (*Mus musculus*) submitted to tannin enriched diets: comparison with sialotropic effects of sympathetic agonists stimulation. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecologia* 2010; 62:837-844.

Matsuo R. Central connections for salivary innervations and efferent impulse formation In Neural mechanisms of salivary gland secretion. Garrett, J.R., Ekström, J., Anderson, L.C. (Eds) *Front Oral Biol*, Karger, 1999; vol 11: 26-43.

Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil* 2007; 34:711-723.

Mizuuchi H, Taketa K. Preferential Salivary-Tipe Hypoamylasemia in Obese Children. *Akta Med Okayama* 1999; 53: 119 – 122.

Moore P.A, Guggenheimer J, Etzel K.R, Weyant R.J, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 281-91.

Negrão A, Licinio J. A Neuroendocrinologia da Leptina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000; 44: 205-214.

Palamim M. R. Funções da saliva para a cavidade oral: aspectos relacionados à mastigação, à deglutição e à fala. *Fonoatual* 1999; 3:19-26.

Pannunzio E, Amancio O, Vitalle M, Souza D, Mendes F, Nicolau J. Analysis of the stimulated whole saliva in overweight and obese school children. *Rev Assoc Med Bras.* 2010; 56: 32-6.

Pedersen A.M, Bardow A, Jensen S.B, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis* 2002; 8:117-129.

Pepino M.Y, Finkbeiner S, Beauchamp G.K, Mennella J.A. Obese women have lower monosodium glutamate taste sensitivity and prefer higher concentrations than do normalweight women. *Obesity* 2010;18:959-965.

Pisiriciler R, Caliskan-Ak E, Emekli-Alturfan E, Yarat A, Canberk Y. Impact of Experimental Hyperlipidemia on Histology of Major Salivary Glands. *Medical Journal of Trakya University* 2009; 26: 283-291.

Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C. Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. *Genes Nutr.* 2009; 4:151-156.

Rao P.V, Reddy A.P, Lu X, Dasaris S, Krishnaprasad A, Biggs E, Roberts J.R, Nagalla S.R. Proteomic Identification of Salivary Biomarkers of Type-2 Diabetes; *J Proteome Res* 2009; 8: 239–245.

Regezi J.A. Oral pathology: clinical-pathologic correlations. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1989.

Riad M, Barton J.R, Wilson J.A, Freeman C.P, Maran A.G. Parotid salivary secretory pattern in bulimia nervosa. *Acta Otolaryngol* 1991;111:392-395.

Rolls E.T. Understanding the mechanisms of food intake and obesity. *Obesity Reviews* 2006; 8:67-72.

- Shi Q, Jackowski G, Hames B.D. Gel Electrophoresis of Proteins. Pág.2-4, 1998.
- Sánchez J, M.Sc M.D, Ph D. Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica* 2005; 36: 50-59.
- Spielman A.I. Interaction of saliva and taste. *J Dent Res.* 1990;69:838-843.
- Tepper B.J. Nutritional implications of genetic taste variation: the role of PROP sensitivity and other taste phenotypes. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:367-88.
- Tomoko N, Ritsuko S, Akane I, Hiram S. Gene Expression Profiles of the Three Major Salivary Glands in Rat. *Biomedical Research* 2010; 31: 387-399.
- Umabiki M, Tsuzaki K, Kotani K, Nagai N, Sano Y, Matsuoka Y, Kitaoka K, Okami Y, Sakane N, Higashi A. The improvement of sweet taste sensitivity with decrease in serum leptin levels during weight loss in obese females. *Tohoku J Exp Med* 2010;220:267-71.
- Van Der Reijden WA, Van Der Kwaakjs, Veeran E.C, Nieuw Amerongen A.V. Analysis of the concentration and output of the whole salivary constituents in patients with Sjögren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 1996;104:335-340.
- Videira, A. *Engenharia Genética- Princípios e aplicações*, Editora Lidel, Pág.55, Lisboa, 2001.
- Von Bultzingsowen I, Sollecito T.P, Fox P.C, Daniels T, Jonsson R, Lockhart P.B, Wray D, Brennan M.T, Carozzo M, Gander B, Fujibayahi T, Navazesh M, Rhodus N.L, Schiodt M. Salivary dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103 (Suppl): S57.e1-S57.e1.
- Zaia D, Zaia C, Lichtig J. Determinação de Proteínas Totais Via Espectrofotometria: Vantagens e Desvantagens dos Métodos Existentes. *Química Nova* 1998; 21.
- Zhang Z, Li Q, Liu F, Sun Y, Zhang J. Prevention of diet-induced obesity by safflower oil: insights at the levels of PPAR α , Orexin, and Ghrelin gene expression of adipocytes in mice. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010; 42: 202-208.

Anexos

Anexo I

Média do peso semanal ao longo do ensaio (Média ± Erro Padrão Média)

semana animal	-1ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª
115	217,3 ±0,37	216,4 ±2,74	228 ±1,37	232,7 ±0,41	239,3	241	242,5 ±1,22	243,3 ±1,58	242 ±1,55	247 ±2,45	248,5 ±2,86	244	244,5 ±7,76	248	253,5 ±2,86	257,5 ±0,41	257	258	258,7 ±1,07
116	172,9 ±6,04	191,3 ±2,64	200,7 ±3,32	215 ±0,41	221	226	231,5 ±2,86	236,7 ±0,79	239 ±1,79	241,5 ±1,22	252 ±0,82	254	253 ±6,53	259	263,5 ±2,86	266,5 ±2,04	274	276	272,3 ±2,15
117	205,4 ±3,59	217,1 ±1,57	226,7 ±2,10	239 ±0,82	237	250	254 ±1,63	250,7 ±1,96	259,3 ±2,09	266,5 ±2,04	258,5 ±0,41	273	254,5 ±5,31	262	265,5 ±2,86	264 ±1,63	267	277	274,7 ±0,79
118	206,1 ±1,84	222,2 ±1,63	236 ±0,52	246,7 ±1,63	253	263	266 ±0	268 ±0,89	273 ±0,89	275 ±0	281,5 ±2,04	290	281 ±3,27	288	291,5 ±2,04	291 ±2,45	291	291	293 ±0,52
119	209,3 ±0,73	218,9 ±2,25	224 ±1,03	228,3 ±1,63	236	239,5	240 ±0	242,7 ±2,44	245,7 ±1,30	249,5 ±0,41	250,5 ±2,04	254	257,5 ±1,22	263	266 ±0,82	270,5 ±1,22	278	278	275,3 ±1,07
120	214,5 ±1,88	232,2 ±0,86	243,7 ±0,60	245,3 ±2,04	254,3	256	265 ±4,08	266 ±0,89	271,3 ±0,30	276 ±0,82	276,5 ±0,41	285	286,5 ±1,22	290	289,5 ±0,41	298,5 ±0,41	304	307	308 ±0,52
121	166,9 ±4,45	189,9 ±0,76	199 ±2,10	208,3 ±1,63	226,7	226	232,5 ±0,41	235,3 ±2,09	241,7 ±0,79	248 ±0,82	252,5 ±1,22	255	244,5 ±4,90	260	262,5 ±0,41	261 ±0,82	270	278	274,3 ±0,30
122	192,9 ±4,04	207,9 ±2,73	213 ±1,37	221,7 ±2,04	223	230	229 ±0,82	238,3 ±2,09	247 ±1,37	237 ±0,82	245,5 ±1,22	242	253 ±0,41	246	239 ±1,63	245,5 ±0,41	245	245	244 ±1,03
123	194,8 ±0,90	206,2 ±0,81	217,3 ±0,30	219,3 ±0,41	225,7	234	237 ±0	243,3 ±0,30	245 ±0,89	249,5 ±1,22	251,5 ±0,41	252	254,5 ±1,22	262	262,5 ±1,22	265 ±0	269	267	263,7 ±1,58
124	199,6 ±4,69	211,4 ±2,17	228 ±2,58	231,3 ±0,82	244	244	246,5 ±0,41	249,3 ±0,79	257,7 ±1,49	262,5 ±0,41	269 ±0,82	276	275,5 ±1,22	278	284 ±2,45	288 ±0	284	289	290 ±1,86
125	208,1 ±5,80	227,6 ±1,34	240,3 ±2,84	249,3 ±3,67	258,3	260	262,5 ±0,41	277,7 ±0,79	278 ±1,55	288 ±2,45	285,5 ±2,86	295	284 ±4,08	294	294 ±0	297,5 ±2,04	305	309	305,7 ±0,79
126	221,8 ±8,45	236,4 ±2,42	252,3 ±3,91	270 ±0,41	277,7	285,5	286,5 ±0,41	300 ±1,79	307 ±2,25	325 ±0	311,5 ±1,22	324	315 ±4,08	322	326 ±0,82	322 ±4,08	331	340	334 ±0
127	194,4 ±7,10	207,7 ±2,52	220 ±1,79	228,7 ±0,41	242	247,5	257,5 ±1,22	261 ±1,03	264 ±0,52	276,5 ±2,04	280 ±0,82	284	284,5 ±0,41	292	294 ±0,82	296 ±2,45	291	297	300,7 ±1,67
128	169,6 ±6,57	191,6 ±1,18	198,3 ±0,79	210,3 ±1,22	217	225,5	228,5 ±1,22	233 ±0,52	239 ±1,86	241,5 ±1,22	240,5 ±2,04	243	239 ±4,08	248	248 ±0,82	251,5 ±2,86	248	252	254 ±1,03
129	160,4 ±6,61	180,6 ±4,70	198,3 ±3,36	216,7 ±1,63	221,7	237,5	242 ±0	252 ±0,89	259 ±0,89	259 ±2,45	264 ±0,82	265	270,5 ±1,22	272	277,5 ±2,04	281 ±0,82	280	274	278,3 ±0,79
130	124,1 ±4,82	146,8 ±4,31	167 ±1,86	185 ±0,41	195,7	210	218,5 ±1,22	228,3 ±1,07	230,7 ±1,58	242,5 ±2,04	243,5 ±0,41	242	246,5 ±0,41	249	247 ±0,82	253 ±3,27	261	252	253 ±0,89
131	143,4 ±6,69	166,9 ±1,30	177 ±3,61	187,7 ±1,22	194	209,5	212,5 ±0,41	221 ±2,37	227,3 ±1,07	223 ±0,82	234,5 ±1,22	228	235,5 ±2,04	240	235,5 ±2,04	242,5 ±1,22	237	241	239 ±1,37
132	163,3 ±5,67	179,7 ±1,26	186,7 ±2,84	202,3 ±1,63	202,3	218	221,5 ±0,41	229 ±1,03	236,3 ±0,79	237,5 ±0,41	244 ±0,82	239	246 ±0,82	251	244 ±0	247 ±1,63	236	240	246 ±0,52
133	206,6 ±3,43	221,1 ±3,58	237,3 ±3,52	247 ±0,82	252	264	261 ±0,82	281 ±0,52	280 ±2,88	290,5 ±0,41	303,5 ±3,67	294	294 ±6,53	310	305,5 ±0,41	317 ±2,45	313	318	321,3 ±1,49
135	223,8 ±0,82	239 ±4,91	248,3 ±1,30	252,3 ±0,82	267	266,5	274 ±1,63	281 ±2,37	280 ±0,52	297 ±0,82	293 ±0,82	298	297,5 ±6,12	308	304 ±0	298 ±9,80	306	316	315,3 ±0,60

Anexo II

Média do consumo semanal (g) (Média ± Erro Padrão Média)

Animal	Semana																		
	-1ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª
115	18,5 ±0,88	19,7 ±0,92	21,3 ±1,00	19,5 ±2,10	19,9 ±1,18	22,6 ±1,27	20,3 ±1,65	18,2 ±1,30	17,5 ±1,31	19,7 ±0,86	16,2 ±0,26	19,6 ±3,29	16,8 ±0,37	13,1 ±3,00	18,1 ±2,22	16,0 ±1,05	12,9	16,7 ±0,12	19,3 ±3,46
116	16 ±1,28	19,7 ±1,48	20,9 ±0,39	20,5 ±1,75	21,3 ±1,12	23,8 ±2,11	21,3 ±1,50	19,8 ±0,59	20,4 ±1,50	19,3 ±1,01	20,4 ±0,14	24,2 ±3,98	18,2 ±1,04	15,4 ±3,79	20,6 ±2,35	16,4 ±0,53	15,4	17,5 ±0,33	23,5 ±4,54
117	21 ±1,29	22,9 ±1,65	22,6 ±0,81	20,2 ±0,43	20,6 ±0,03	26,3 ±2,61	23,9 ±2,29	20,7 ±2,15	20,5 ±0,56	20,6 ±1,02	17,8 ±1,28	22,7 ±1,19	17,2 ±0,10	14,6 ±3,64	19,8 ±2,19	16,3 ±0,58	14,9	17,2 ±1,68	21,0 ±2,72
118	20,8 ±1,85	19,9 ±1,45	17,9 ±0,67	17,6 ±1,35	17,8 ±1,90	21,9 ±2,40	19,3 ±1,52	16,2 ±0,88	16,9 ±1,73	17,4 ±1,89	18,0 ±1,05	19,2 ±1,39	15,9 ±0,43	14,7 ±1,70	17,8 ±2,14	14,1 ±0,39	12,7	15,1 ±0,45	16,6 ±2,23
119	21,7 ±1,43	19,9 ±1,38	16,2 ±0,88	15,0 ±0,94	16,5 ±0,21	19,5 ±1,56	17,9 ±2,28	15,8 ±1,28	15,8 ±1,08	14,7 ±1,11	15,2 ±1,13	20,1 ±3,98	15,2 ±0,57	15,0 ±0,66	14,2 ±1,05	14,7 ±0,67	13,9	14,3 ±0,10	15,1 ±0,96
120	19,3 ±1,35	21,3 ±1,48	18,2 ±0,27	15,7 ±1,44	16,2 ±0,33	19,8 ±1,07	17,5 ±1,28	15,9 ±1,11	16,8 ±1,09	16,1 ±1,54	16,0 ±0,53	20,4 ±3,27	15,5 ±0,24	13,9 ±2,01	14,4 ±0,53	14,3 ±0,02	14,1	14,8 ±0,20	14,9 ±0,79
121	17,8 ±1,67	21,2 ±1,47	21,2 ±0,24	20,1 ±0,87	20,9 ±1,64	25,2 ±2,44	24,8 ±3,75	26,4 ±5,02	21,5 ±1,69	20,8 ±0,81	19,9 ±0,31	23,9 ±3,55	18,5 ±0,18	18,3 ±1,77	19,2 ±3,20	16,9 ±0,26	15,4	17,5 ±1,20	22,6 ±3,36
122	20,3 ±0,33	20,3 ±1,95	16,7 ±0,97	16,3 ±0,97	15,2 ±0,61	19,3 ±2,25	18,1 ±2,78	15,8 ±1,02	16,0 ±1,68	14,6 ±1,38	16,0 ±0,16	19,5 ±4,07	13,8 ±0,19	14,5 ±0,76	12,0 ±0,79	13,2 ±0,32	11,7	12,4 ±1,01	13,2 ±0,21
123	18,5 ±1,58	17,1 ±2,39	17,1 ±0,91	14,9 ±1,53	15,7 ±0,17	19,2 ±2,30	19,5 ±2,06	16,3 ±0,74	16,2 ±1,63	16,2 ±0,44	16,2 ±0,50	17,9 ±2,04	15,8 ±0,14	14,7 ±1,90	14,3 ±1,18	14,3 ±0,22	13,0	14,1 ±0,73	14,6 ±0,86
124	21,7 ±1,31	20,1 ±1,77	18,1 ±0,29	16,3 ±0,80	17,3 ±3,46	19,6 ±2,61	17,1 ±1,05	16,2 ±1,07	17,3 ±0,64	16,0 ±0,46	17,5 ±0,55	18,3 ±0,64	16,5 ±0,24	14,9 ±1,85	14,9 ±1,14	15,1 ±0,01	14,0	14,6 ±1,31	15,1 ±0,95
125	20,7 ±9,50	21,2 ±1,68	19,6 ±0,79	15,8 ±3,16	16,9 ±2,27	20,8 ±1,32	19,6 ±2,98	18,5 ±0,18	18,2 ±0,79	17,8 ±4,11	16,9 ±0,26	20,1 ±2,09	16,5 ±0,39	15,8 ±1,11	17,8 ±2,55	14,3 ±0,63	13,9	15,5 ±0,89	19,0 ±1,81
126	22,5 ±0,76	20,6 ±1,12	18,6 ±1,39	17,2 ±1,24	18,5 ±2,51	22,5 ±1,93	20,9 ±2,18	19,7 ±0,89	20,5 ±1,29	19,3 ±0,74	17,2 ±1,49	23,1 ±1,94	17,9 ±1,02	15,5 ±2,71	19,7 ±2,81	16,1 ±0,13	15,6	16,8 ±1,67	22,8 ±4,27
127	15,8 ±1,39	17,9 ±0,70	18,2 ±1,16	16,6 ±1,95	15,6 ±2,91	19,9 ±0,28	17,5 ±1,17	16,6 ±0,86	17,4 ±1,26	16,7 ±0,89	16,8 ±0,72	20,8 ±3,26	16,2 ±0,11	16,1 ±1,38	12,7 ±7,21	13,9 ±0,75	12,2	14,4 ±0,37	14,4 ±1,91
128	18,5 ±1,15	20,8 ±1,64	18,5 ±0,15	18,7 ±1,50	19,2 ±1,21	23,3 ±3,75	20,9 ±1,90	18,7 ±0,90	19,4 ±1,56	17,4 ±0,83	15,7 ±0,92	21,4 ±3,43	15,9 ±0,02	15,2 ±2,67	17,5 ±2,33	15,4 ±2,07	13,0	14,8 ±0,73	20,9 ±1,27
129	18,3 ±1,48	21,6 ±1,78	23,4 ±2,46	21,7 ±0,51	20,3 ±0,24	26,1 ±2,15	24,7 ±1,89	23,2 ±1,79	23,2 ±2,04	19,8 ±1,04	20,5 ±0,29	23,1 ±2,52	20,1 ±0,66	17,3 ±2,33	18,2 ±1,25	18,6 ±0,64	16,0	18,8 ±0,04	17,9 ±1,05
130	11 ±2,06	16,9 ±0,89	16,3 ±0,65	15,7 ±2,25	16,9 ±3,12	20,0 ±1,99	17,5 ±0,66	16,1 ±1,43	17,9 ±3,10	15,3 ±0,62	14,9 ±0,03	16,7 ±2,19	14,4 ±0,30	14,0 ±1,19	13,4 ±1,39	13,3 ±1,02	12,8	12,0 ±1,68	13,8 ±0,50
131	15,5 ±0,61	16,9 ±1,76	15,5 ±0,59	14,6 ±0,94	15,5 ±1,28	19,5 ±1,95	17,6 ±1,67	16,3 ±1,14	15,7 ±1,80	16,1 ±1,23	16,5 ±0,39	18,9 ±3,79	14,9 ±0,28	12,6 ±2,38	13,4 ±1,29	19,5 ±0,24	11,3	14,0 ±0,19	14,7 ±1,30
132	18,5 ±0,88	17,5 ±1,75	15,7 ±0,89	15,5 ±0,54	16,3 ±1,02	19,6 ±1,85	15,9 ±1,68	15,5 ±0,69	15,6 ±1,86	15,0 ±0,69	16,3 ±0,23	17,5 ±4,22	14,1 ±0,23	13,1 ±1,89	11,9 ±1,31	13,0 ±1,14	10,0	12,5 ±0,71	12,7 ±1,39
133	22 ±0,92	20,2 ±1,75	19,6 ±0,32	17,7 ±1,61	19,4 ±3,63	22,8 ±3,55	20,7 ±1,07	20,4 ±1,05	20,2 ±2,01	18,6 ±1,21	20,9 ±0,94	23,4 ±6,28	17,9 ±0,17	16,3 ±3,08	31,3 ±12,25	17,4 ±1,46	14,4	15,5 ±0,96	22,6 ±2,67
135	18,2 ±2,85	22,4 ±1,31	18,7 ±0,39	17,1 ±2,48	18,6 ±2,57	22,4 ±2,20	18,9 ±0,06	19,1 ±1,33	18,3 ±1,09	22,9 ±4,57	18,1 ±0,57	21,9 ±1,50	17,8 ±0,16	15,4 ±2,73	17,6 ±1,75	17,8 ±8,70	13,7	15,8 ±1,61	19,1 ±2,12

Anexo III

Dose ingerida(g) /semana

Semana Animal	Semana																		
	-1ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª
115	0,10	0,09	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,07	0,05	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07
116	0,11	0,10	0,10	0,09	0,10	0,11	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,09	0,07	0,06	0,08	0,06	0,06	0,06	0,09
117	0,11	0,11	0,10	0,08	0,09	0,11	0,09	0,08	0,08	0,08	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08
118	0,11	0,09	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05	0,04	0,05	0,06
119	0,10	0,09	0,07	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
120	0,10	0,09	0,07	0,06	0,06	0,08	0,07	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
121	0,11	0,11	0,11	0,10	0,09	0,11	0,11	0,11	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08
122	0,11	0,10	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,06	0,06	0,06	0,08	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
123	0,10	0,08	0,08	0,07	0,07	0,08	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06
124	0,12	0,10	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
125	0,15	0,09	0,08	0,06	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06
126	0,11	0,09	0,07	0,06	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,07
127	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06	0,08	0,07	0,06	0,08	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05
128	0,11	0,11	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,08	0,09	0,07	0,07	0,09	0,07	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,08
129	0,13	0,12	0,12	0,10	0,09	0,11	0,10	0,09	0,08	0,08	0,08	0,09	0,07	0,06	0,07	0,07	0,06	0,07	0,06
130	0,15	0,12	0,10	0,08	0,09	0,10	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
131	0,13	0,10	0,09	0,08	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06
132	0,13	0,10	0,08	0,08	0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05
133	0,12	0,09	0,08	0,07	0,08	0,09	0,08	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,06	0,05	0,10	0,05	0,05	0,05	0,07
135	0,10	0,09	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,07	0,07	0,08	0,06	0,07	0,06	0,05	0,06	0,06	0,04	0,05	0,06

Anexo IV

Quantidade Calórica (Kcal)/semana

Semana	-1ª	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª	17ª	18ª
Animal																			
115	57,4	61,2	65,9	60,4	61,8	70,0	62,9	56,6	54,1	61,1	50,1	60,7	52,1	40,6	56,1	49,7	40,0	51,8	59,8
116	49,6	61,2	65,1	63,5	66,0	73,9	66,1	61,3	63,3	59,7	63,2	75,1	56,3	47,7	63,7	50,8	47,7	54,2	72,7
117	65,1	71,0	70,0	62,7	64,0	81,6	74,3	64,2	63,6	63,8	55,0	70,4	53,3	45,2	61,4	50,4	46,1	53,3	64,9
118	64,5	76,0	68,1	67,0	67,6	83,3	69,5	61,3	64,2	66,2	68,6	73,1	60,6	55,8	67,8	53,7	48,4	57,2	62,9
119	67,2	75,5	61,5	57,2	62,6	73,9	68,1	60,2	60,0	56,0	57,9	76,4	57,7	57,1	54,1	55,7	53,0	54,4	57,5
120	59,9	81,0	69,2	59,5	61,4	75,2	66,6	60,4	64,0	61,0	60,8	77,5	59,1	52,9	54,8	54,3	53,7	56,1	56,6
121	55,3	65,8	65,7	62,3	64,9	78,1	76,7	81,8	66,8	64,5	61,7	74,1	57,3	56,6	59,5	52,5	47,6	54,3	70,0
122	63,0	77,2	63,5	61,8	57,9	73,5	68,9	60,1	60,9	55,3	60,8	74,0	52,4	55,1	45,7	50,0	44,6	47,2	50,3
123	57,4	64,8	65,0	56,7	59,6	73,0	74,0	61,8	61,5	61,4	61,5	68,2	60,2	56,1	54,4	54,4	49,3	53,5	55,6
124	67,2	76,5	68,7	62,1	65,6	74,6	65,1	61,4	65,8	61,0	66,6	69,5	62,8	57,0	56,8	57,5	53,2	55,6	57,4
125	64,1	80,5	74,6	60,1	64,0	79,1	74,4	70,3	69,1	67,5	64,5	76,5	62,6	60,0	67,7	55,4	52,8	59,0	72,2
126	69,8	78,1	70,5	65,3	70,3	85,5	79,6	75,0	77,8	73,4	65,4	87,8	68,0	59,0	74,8	61,3	59,2	64,1	86,5
127	49,1	68,1	69,2	63,2	59,1	75,8	66,5	63,1	66,0	63,4	63,9	79,2	61,7	61,0	48,2	52,9	46,3	54,7	54,6
128	57,4	64,6	57,4	58,0	59,6	72,4	64,8	58,1	60,2	54,0	48,6	66,4	49,3	47,1	54,1	47,8	40,2	45,8	64,7
129	56,8	67,1	72,7	67,2	63,0	81,0	76,6	72,1	71,9	61,5	63,6	71,6	62,4	53,5	56,4	57,8	49,7	58,2	55,4
130	34,1	64,4	61,8	59,6	64,4	76,1	66,6	61,2	68,0	58,2	56,4	63,4	54,7	53,4	51,1	50,6	48,7	45,8	52,2
131	48,1	64,4	58,9	55,6	58,7	74,0	66,7	62,0	59,5	61,0	62,8	72,1	56,6	47,8	51,0	51,4	43,2	53,2	55,9
132	57,4	66,3	59,8	59,1	61,9	74,5	60,6	58,8	59,3	57,0	62,0	66,5	53,6	50,0	45,3	49,4	38,2	47,4	48,4
133	68,2	76,8	74,5	67,2	73,9	86,6	78,8	77,6	76,7	70,8	79,6	89,0	68,2	62,0	118,8	66,0	54,8	58,8	85,9
135	56,3	85,3	71,1	65,0	70,7	84,9	71,7	72,6	69,5	87,3	68,09	83,3	67,8	58,6	66,7	67,8	52,0	60,2	72,4

Anexo V

Concentração proteica (µg/ml) das amostras de saliva recolhidas ao longo do ensaio

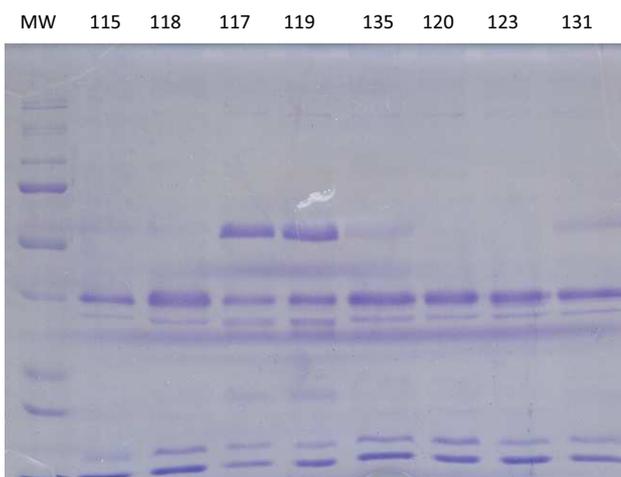
Animal Dia da Recolha	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	135
20-12-2010	407,3	550,6	641,5	378,9	443,1	878,3	602,9	381,6	571,1	3439,4	210,8	58,9	383,0	742,8	1425,3	—	603,6	582,7	568,5	1251,1
03-01-2011	—	414,9	—	—	—	—	435,6	—	—	6410,3	338,3	3901,6	540,2	6315,4	542,7	755,8	492,2	463,7	387,9	—
25-01-2011	429,2	2423,4	2453,6	601,8	679,6	572,7	1852,4	765,8	1520,4	415,6	669,1	836,4	1273,4	37655	1272,5	423,2	565,2	941,2	714,7	503,8
21-02-2011	685,3	1118,3	6468,9	728,1	593,8	344,6	344,6	363,3	586,8	18248,2	1178,7	38330	557,5	7175,7	281,3	1083,8	5645	7168,3	650,9	1783,4
08-04-2011	922,2	1403,2	849,1	833,9	—	—	768,8	—	—	—	618,5	4025,3	—	4878,7	—	—	—	—	757,6	2544,9
02-05-2011	648,7	999,3	712,4	1017,6	462,2	356,1	848,2	331,9	545,8	1236,4	870	2288,4	503,5	1231,4	394,4	680	459,5	365	806,5	541,6

Os códigos 115, 116, 117, 121, 128 e 129 dizem respeito aos animais que fazem parte do grupo controlo. Os códigos 118, 119, 120, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 130, 131, 132, 133 e 135 dizem respeito aos animais que ingeriram a ração rica em gordura.

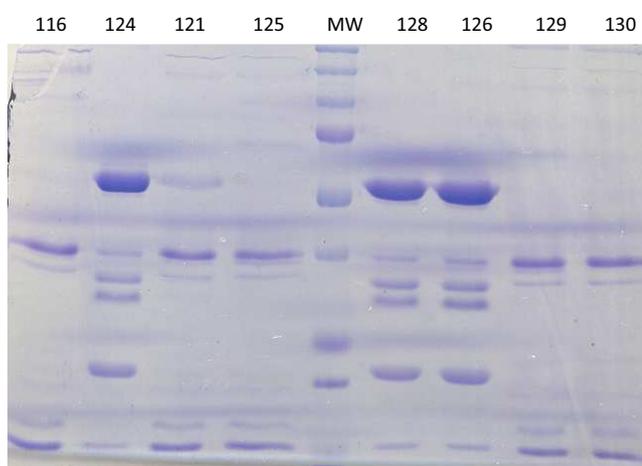
— Amostras para as quais não foram efectuadas recolhas nos dias assinalados

Anexo VI

Gel da primeira recolha (20-12-2010)

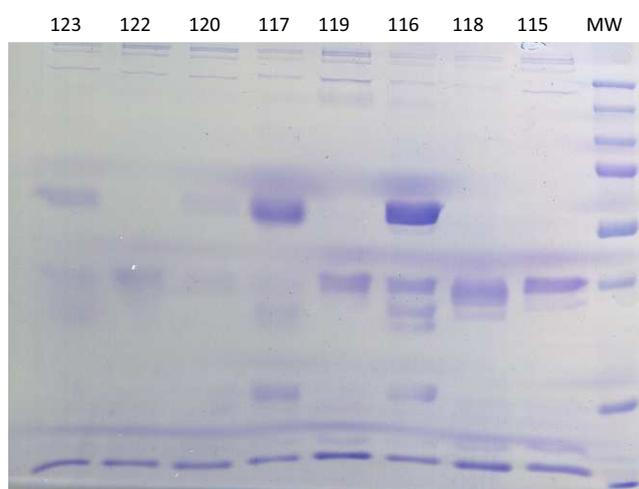
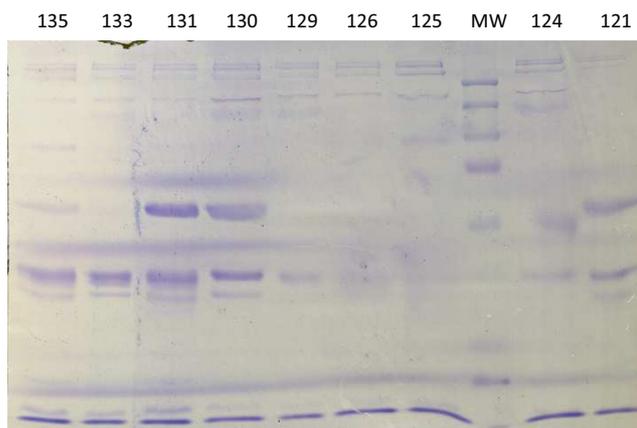


Gel da segunda recolha (03-01-2011)



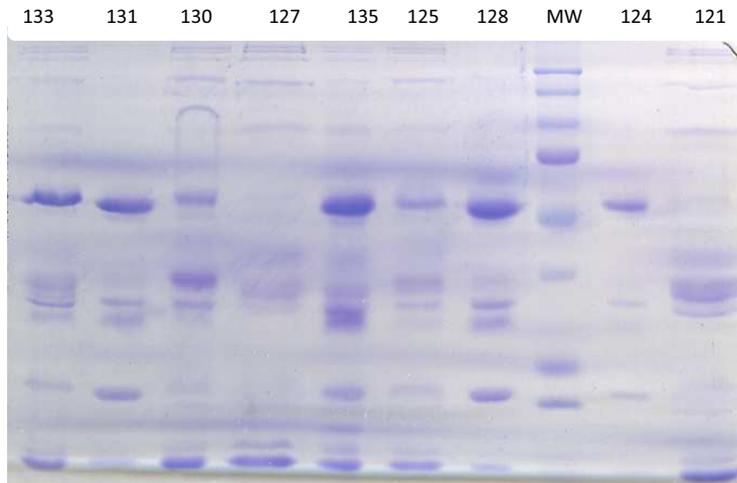
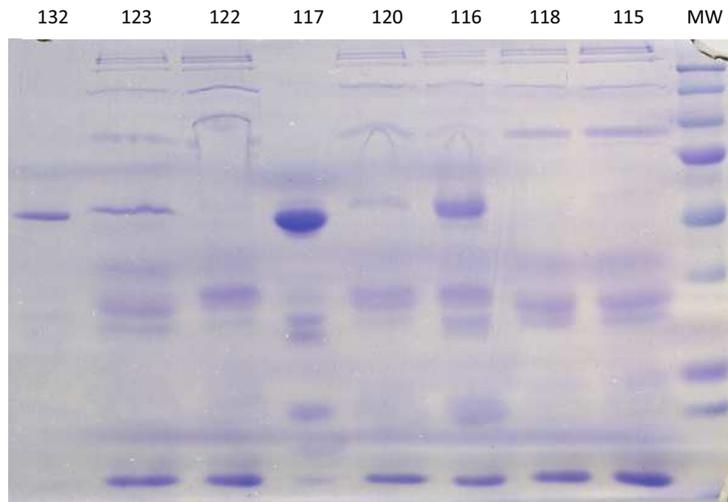
Nota: Os códigos 115, 116, 117, 121, 128 e 129 dizem respeito aos animais do grupo controlo. Os códigos 118, 119, 120, 124, 125, 126, 130, 131 e 135 dizem respeito aos animais que ingeriram a ração rica em gordura. MW- Marcador de Massas Moleculares.

Géis da terceira recolha (25-01-2011)

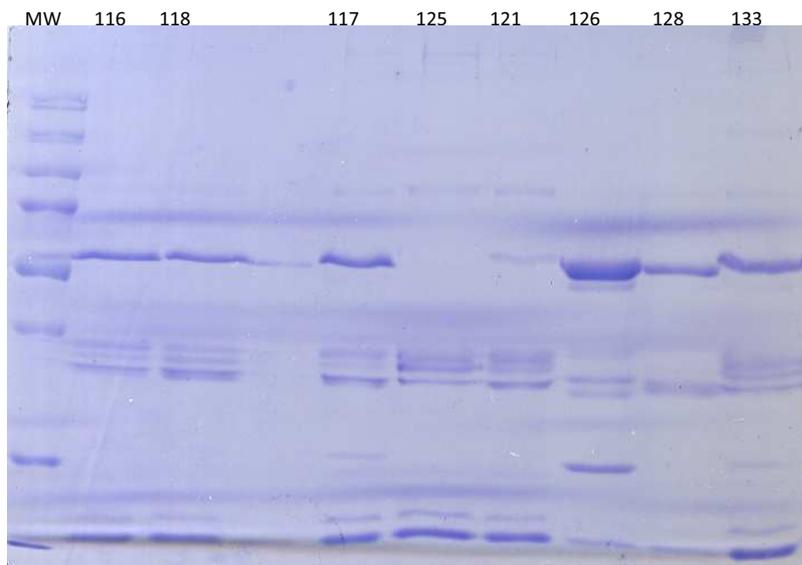


Nota: Os códigos 115, 116, 117, 121 e 129 dizem respeito a animais do grupo controlo. Os códigos 118, 120, 122, 123, 124, 125, 126, 130, 131, 133 e 135 dizem respeito a animais que ingeriram ração hiperlipídica.

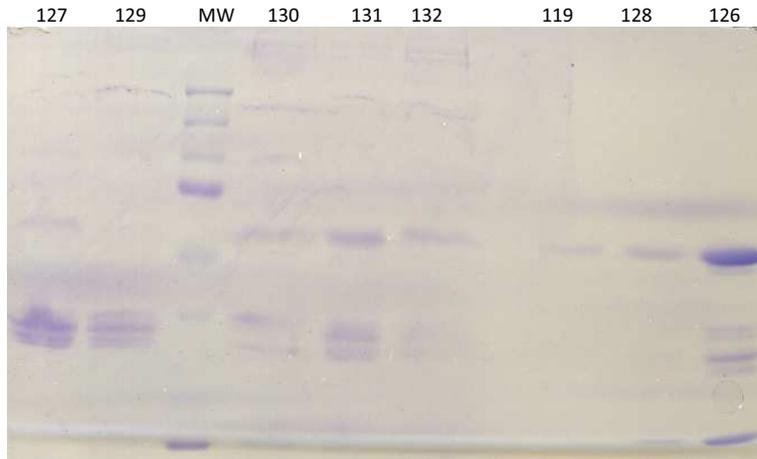
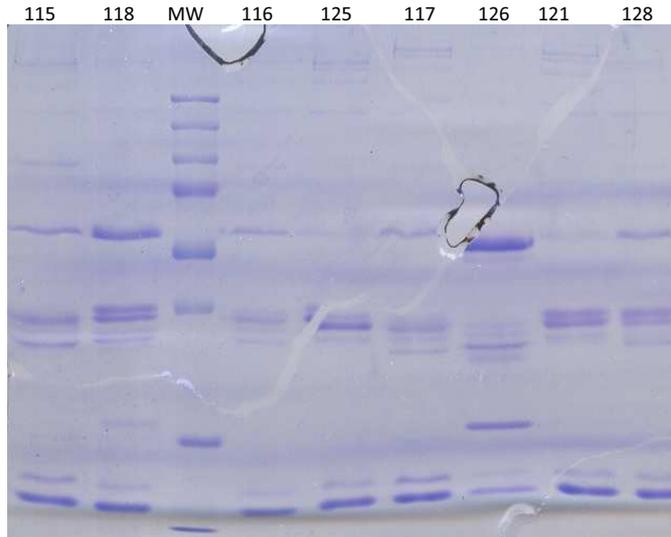
Géis da quarta recolha (21-02-2011)



Gel da quinta recolha (08-04-2011)



Géis da última recolha (02-05-2011)



Anexo VII

% do volume da lane em cada gel de cada recolha ao longo do ensaio (média ± Erro Padrão Média)

Recolha	Controlo	Tratamento
Primeira e segunda	9,74 ± 2,24	11,76 ± 2,04
Terceira	16,25 ± 3,28	8,78 ± 1,78
Quarta	9,58 ± 2,21	10,37 ± 2,75
Quinta	5,45 ± 1,16	8,33 ± 1,67
Última	4,71 ± 0,59	6,58 ± 1,33

Anexo VIII

Presença de lípidos nas estruturas de glândulas salivares de animais do grupo controlo e tratamento

Controlo		
Glândula	Localização	Intensidade
Parótida	Ácidos	+
	Ductos	-
Submandibular	Ácidos	+++
	Ductos	+
Sublingual	Ácidos	-
	Ductos	-
Tratamento		
Parótida	Ácidos	+
	Ductos	-
Submandibular	Ácidos	++
	Ductos	+
Sublingual	Ácidos	-
	Ductos	-

-, negativo; +, fraco; ++, moderado; +++, forte.

Anexo IX

Determinação do teor em ácidos gordos presentes em óleo de girassol

Amostra: Óleo de girassol 100% vegetal (Intermarché)

Validade: 28/02/2012 (aberto em 01/09/2011 para efectuar o ensaio)

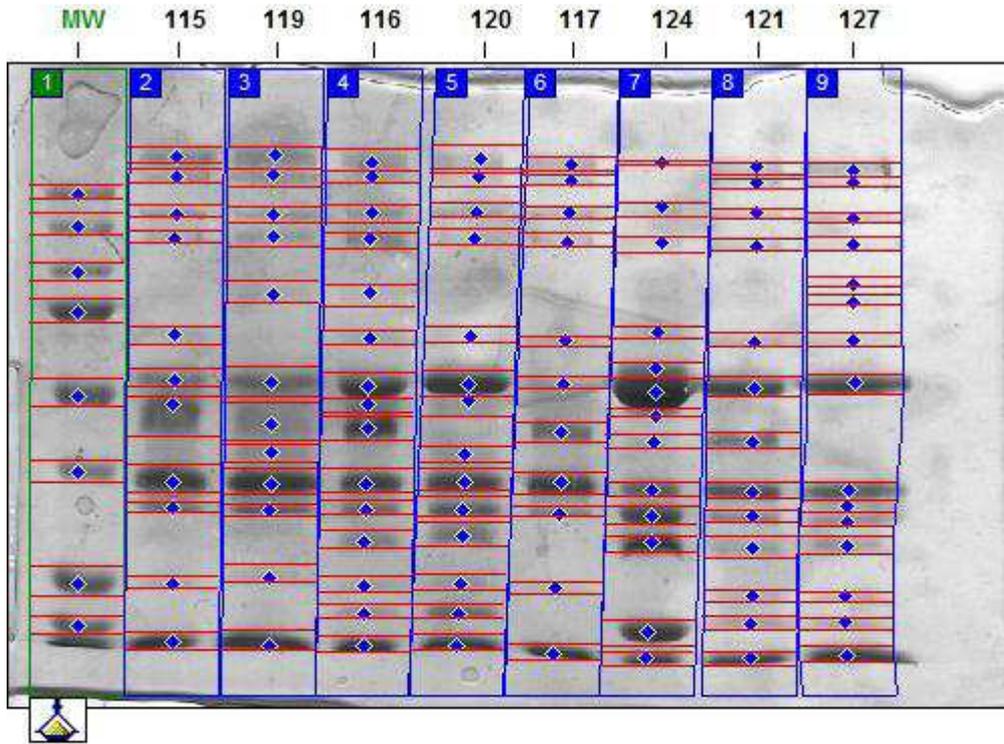
Lote: 060B L1010911

Derivado éster metílico do ácido gordo	tr ± DP (min) (n=3)	Teor ± DP (%) (n=3)
C12:0 Lauric acid methyl ester	7,314 ± 0,006	0,008 ± 0,001
C14:0 myristic acid methyl ester	11,609 ± 0,002	0,045 ± 0,008
C15:0 pentadecanoic acid methyl ester	13,927 ± 0,002	0,011 ± 0,002
C16:0 palmitic acid methyl ester	16,302 ± 0,008	5,39 ± 0,04
C16:1 palmitoleic acid methyl ester	16,642 ± 0,003	0,0168 ± 0,0006
C17:0 heptadecanoic acid methyl ester	18,500 ± 0,003	0,031 ± 0,001
C17:1 cis-10-heptadecenoic acid methyl ester	18,949 ± 0,002	0,027 ± 0,002
C18:0 Stearic acid methyl ester	20,84 ± 0,02	2,990 ± 0,009
C18:1n9c Oleic acid methyl ester	21,28 ± 0,02	35,74 ± 0,02
C18:2n6c Linoleic acid methyl ester	22,27 ± 0,03	54,056 ± 0,009
C20:0 Arachidic acid methyl ester	23,333 ± 0,004	0,051 ± 0,006
C18:3n6 γ-Linolenic acid methyl ester	24,824 ± 0,002	0,24 ± 0,01
C18:3n3 Linolenic acid methyl ester	25,177 ± 0,002	0,16 ± 0,01
C21:0 Heneicosanoic acid methyl ester	26,082 ± 0,002	0,013 ± 0,005
C20:4n6 arachidonic acid methyl ester	28,671 ± 0,003	0,22 ± 0,04
C23:0 tricosanoic acid methyl ester	29,288 ± 0,001	0,064 ± 0,004
C24:0 lignoceric acid methyl ester	30,4937 ± 0,0006	0,041 ± 0,003
C20:5n3 cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid methyl ester	32,539 ± 0,001	0,329 ± 0,004
C22:6n3 cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid methyl ester	32,985 ± 0,003	0,025 ± 0,004

Obs: A quantificação foi efectuada com base nos derivados ésteres metílicos dos ácidos gordos correspondentes; DP- desvio padrão; tr- tempo de retenção (Omegawax 320 capillary column 30m, 0.32mm,0.25µm); ensaio triplicado (n=3).

Anexo X

Analysis Report: controlo.tif



Lane Table

Lane	Bands	Band Volume	Lane Volume
MW	8	290784,09	436382,99
115	11	295280,62	386092,99
119	12	341345,68	437073,52
116	15	348576,30	459455,72
120	14	357336,00	581555,60
117	11	709459,00	2381171,00
124	13	1128026,00	2536808,00
121	13	827992,00	2104338,00
127	15	858080,00	1916806,00

Lane Data Report: controlo.tif, Lane 1

Summary

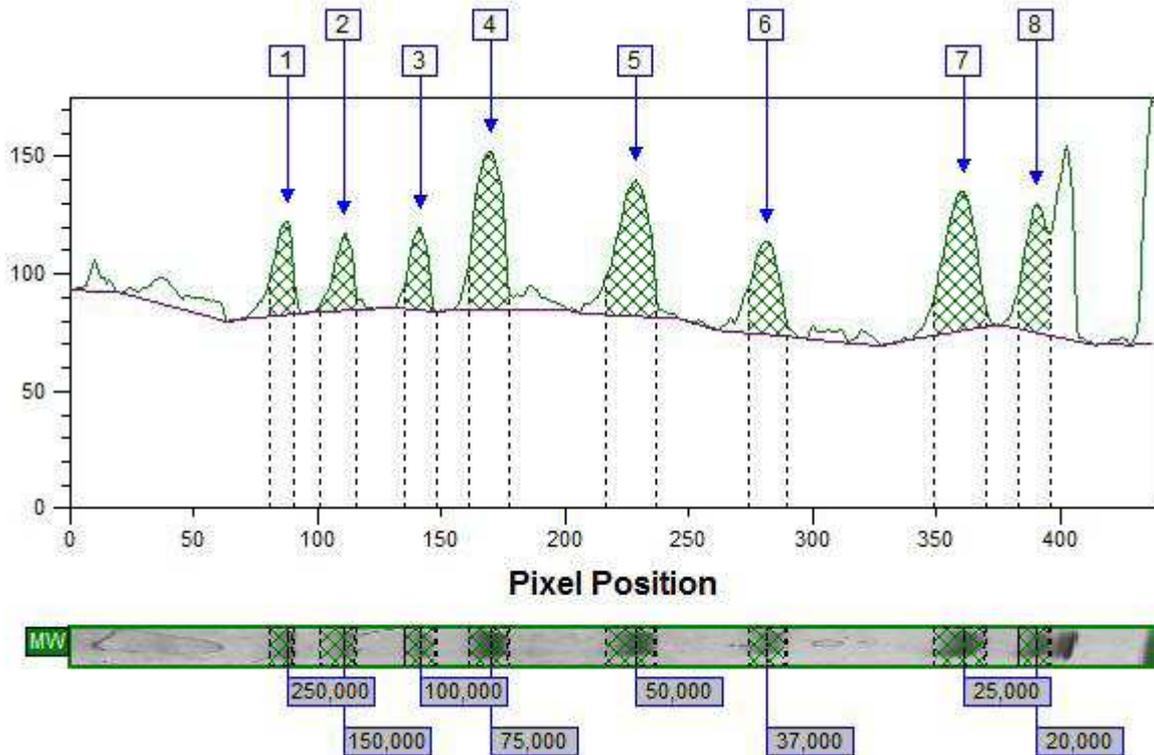
Name: MW

Background

Background Type: Rolling Disc
 Rolling Disc Radius: 200

Band Detection

Automatic Detection: Yes
 Minimum Band Slope: 218
 Band Noise Factor: 2
 Percentage Maximum Peak: 0
 Maximum Peak Measure: Lane
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Name	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	Peak Height	Area
1		16,94	20617,80	74989,00	-	39,80	660
2		21,36	18304,00	101629,00	-	33,05	990
3		27,33	19241,76	91781,00	-	35,01	858
4		32,72	55221,52	150253,00	-	67,18	1122
5		44,07	54463,50	162766,00	-	57,90	1320
6		54,27	30742,00	109014,00	-	39,27	1056
7		69,48	56440,29	161003,00	-	59,48	1386
8		75,25	35753,21	100368,00	-	54,60	858

Band No	Band %	Band %(Calib)	Lane %	MW (kd)	Rf	Width (mm)
1	7,090	0,000	4,725	250,000	0,201	1,92
2	6,295	0,000	4,194	150,000	0,253	2,89
3	6,617	0,000	4,409	100,000	0,324	2,50
4	18,991	0,000	12,654	75,000	0,388	3,27
5	18,730	0,000	12,481	50,000	0,523	3,85

Band No	Band %	Band %(Calib)	Lane %	MW (kd)	Rf	Width (mm)
6	10,572	0,000	7,045	37,000	0,644	3,08
7	19,410	0,000	12,934	25,000	0,824	4,04
8	12,295	0,000	8,193	20,000	0,893	2,50

Lane Data Report: controlo.tif, Lane 2

Summary

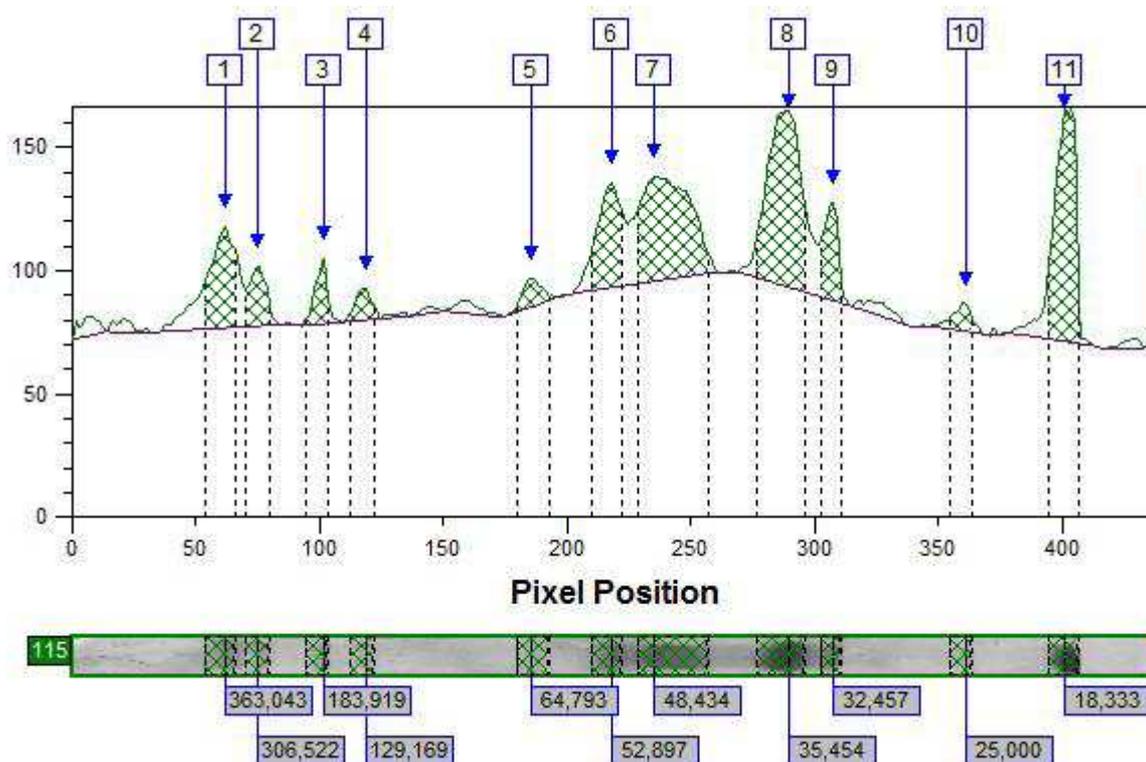
Name: 115

Background

Background Type: Rolling Disc
 Rolling Disc Radius: 200

Band Detection

Automatic Detection: Yes
 Minimum Band Slope: 218
 Band Noise Factor: 2
 Percentage Maximum Peak: 0
 Maximum Peak Measure: Lane
 Edge Detection Method: Automatic Edges
 Band Positions Edited: Yes



Band Table

Band No	Name	Position (mm)	Volume	Vol+BkGnd	Calib Vol(ug)	Peak Height	Area
1		11,93	25037,88	85837,00	-	41,00	792
2		14,43	12709,19	63947,00	-	23,91	660
3		19,63	9168,25	55678,00	-	26,24	594
4		22,90	5613,00	53115,00	-	12,74	594
5		35,80	6435,57	79789,00	-	11,45	858
6		41,96	25974,86	99497,00	-	42,58	792
7		45,23	62619,69	241601,00	-	42,02	1848
8		55,81	67998,89	186461,00	-	71,80	1254
9		59,28	16492,39	63109,00	-	39,72	528
10		69,48	4912,73	49943,00	-	11,15	594
11		77,17	58318,18	114991,00	-	94,60	792

Band No	Band %	Band %(Calib)	Lane %	MW (kd)	Rf	Width (mm)
1	8,479	0,000	6,485	363,043	0,142	2,31
2	4,304	0,000	3,292	306,522	0,171	1,92

Band No	Band %	Band %(Calib)	Lane %	MW (kd)	Rf	Width (mm)
3	3,105	0,000	2,375	183,919	0,233	1,73
4	1,901	0,000	1,454	129,169	0,272	1,73
5	2,179	0,000	1,667	64,793	0,425	2,50
6	8,797	0,000	6,728	52,897	0,498	2,31
7	21,207	0,000	16,219	48,434	0,537	5,39
8	23,029	0,000	17,612	35,454	0,662	3,66
9	5,585	0,000	4,272	32,457	0,703	1,54
10	1,664	0,000	1,272	25,000	0,824	1,73
11	19,750	0,000	15,105	18,333	0,916	2,31