



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIENCIA E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Alterações nas glândulas salivares provocadas
por hiperleptinémia em modelo animal**

JOANA ISABEL DA SILVA FERREIRA

Orientação: Elsa Cristina Carona de Sousa Lamy;
Fernando Manuel Salvado Capela e Silva

Mestrado em BIOQUÍMICA

Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

Quero expressar um agradecimento muito especial à minha orientadora, a professora Elsa Lamy por todo o seu apoio, paciência, disponibilidade e dedicação que sempre me demonstrou. Sem ela este trabalho dificilmente se concretizava.

Agradeço também ao professor Doutor Fernando Capela e Silva por toda a disponibilidade, apoio e conhecimentos que sempre transmitiu.

À Anabela Cabeça e à Dona Jesuína Mosca pela disponibilidade que sempre demonstraram, sempre prontas a ajudar em tudo, o meu muito obrigado.

À engenheira Luísa Fialho do laboratório de anatomia patológica do hospital veterinário da universidade de Évora, pela disponibilidade e ajuda na preparação das lâminas para histologia e com as técnicas de Imunohistoquímica.

Um obrigado muito especial aos meus pais e irmão, por sempre me ajudarem e apoiarem em todas as minhas decisões. A eles devo a pessoa que sou.

Quero ainda agradecer às minhas amigas Raquel, Joana, Lúcia, Sílvia por toda amizade e por sempre estarem presentes

E por fim, mas não menos importante, ao meu namorado que sempre me atura, acredito que às vezes não seja fácil, obrigada por seres a pessoa fantástica que és.

Índice

Índice de Figuras	V
Índice de Tabelas	VII
Abreviaturas	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
I. Fundamentos Teóricos	1
1.1. Secreção salivar.....	1
1.1.1. Saliva	1
1.1.2. Glândulas Salivares.....	2
1.1.3. Regulação da secreção salivar.....	5
1.2. Leptina	6
1.2.1. Características e funções da leptina.....	6
1.2.2. Mecanismos de ação – recetores de leptina.....	7
1.2.3. Ação da leptina nas glândulas salivares	9
1.2.4. Função do enzima alfa-amilase	10
II. Problemática	12
III. Objetivos	13
3.1. Objetivo geral	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
IV. Materiais e métodos	14
4.1. Estratégia adotada	14
4.2. Organigrama	15
V. Resultados	28
VI. Conclusões	46
VII. Bibliografia	47
VIII. Anexos	52

Índice de Figuras

Figura 1: Localização e estrutura das principais glândulas salivares	3
Figura 2: Constituição histológica das glândulas salivares	4
Figura 3: Estrutura da leptina	6
Figura 4: Representação esquemática dos diferentes recetores de leptina (Ob-R) .	8
Figura 5: Efeito da união da leptina ao seu recetor	9
Figura 6: Mecanismo básico da imuno-histoquímica	20
Figura 7: Reação da oxidação carbonila pelo reagente de DNS.....	22
Figura 8: Representação esquemática da sandwich utilizada para a transferência de proteínas do gel de electroforese para a membrana	26
Figura 9: Valor de áreas (A) e perímetros (B) dos ácinos serosos da língua	28
Figura 10: Valor de áreas (A) e perímetros (B) dos ácinos mucosos da língua	29
Figura 11: Valor de áreas (A) e perímetros (B) dos ácinos serosos da parótida	29
Figura 12: Valor de áreas (A) e perímetros (B) dos ácinos sero-mucosos das glândulas submandibular/sublingual.....	30
Figura 13: Medição de áreas de ductos da glândula submandibular (média \pm erro padrão).....	30
Figura 14: Imunomarcação para alfa-amilase.....	32
Figura 15: Imunomarcação para recetor de leptina	34
Figura 16: Exemplo de curva padrão de BSA.....	35
Figura 17: Exemplo de curva de glucose usada na determinação da atividade enzimática	36
Figura 18: Atividade enzimática em ambas as frações (citossólica e mitocondrial) da glândula parótida.....	37
Figura 19: Atividade enzimática em ambas as frações (citossólica e mitocondrial) da glândula submandibular/sublingual.....	38
Figura 20: Somatório da contribuição de ambas as frações (citossólica e mitocondrial) em cada uma das glândulas estudadas, parótida e submandibular.....	38
Figura 21: Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração citossólica.....	39
Figura 22: Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração mitocondrial	39
Figura 23: Exemplo de banda de uma lane do grupo leptina e soro na fração citossólica	40

Figura 24: Exemplo de banda de uma lane do grupo leptina e soro na fração mitocondrial.....	40
Figura 25: Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração membrana da glândula submandibular/sublingual.....	41
Figura 26: Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração membrana da glândula parótida	41
Figura 27: Comparação entre a expressão de recetores de leptina na fração membrana das glândulas parótida	42
Figura 28. Comparação entre a expressão de recetores de leptina na fração membrana das glândulas submandibular/sublingual	42

Índice de Tabelas

Tabela 1. Anticorpo utilizado na marcação imuno-histoquímica	18
Tabela 2: Intensidade de coloração para a alfa-amilase nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores	31
Tabela 3: Intensidade de coloração para o recetor de leptina nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores	33

Abreviaturas

BSA (*Bovine Serum Albumin*)- Albumina de soro bovino

CCK - Colecistocinina

CME – Células mioepiteliais

DNS- Ácido dinitrosalicílico

JAK- *Janus Activated Kinases*

LEPR – Recetores de leptinas

Ob-R- Recetor da leptina Ob

PBS- Solução de tampão fosfato

PHSF- Phenylmethane Sulfonyl Fluoride

SDS-PAGE- Dodecil-Sulfato de Sódio de Poliacrilamida

STAT – *Sinal Transducer 37 and Activators of Transcription*

SNC- Sistema Nervoso Central

Resumo

Nos últimos anos têm surgido estudos sugerindo uma participação de péptidos e hormonas na regulação da secreção salivar. A leptina é um péptido codificado pelo gene *ob* responsável pela indução de saciedade.

Não se sabe se a ação da leptina nas glândulas salivares é direta ou indireta, mas a existência de recetores para este péptido nas glândulas salivares, aponta no sentido de uma possível regulação direta das glândulas por parte da leptina.

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a existência de alterações nas glândulas salivares induzidas por níveis elevados de leptina circulante. Observaram-se diminuições das áreas dos ácinos serosos e aumentos da atividade enzimática de amílase em indivíduos hiperleptinémicos. A expressão de recetores de leptina, aparentemente, aumentou nas glândulas submandibulares, com a administração de leptina. Assim, a hiperleptinemia provoca alterações nas glândulas salivares, apontando para um possível papel da leptina na regulação destas estruturas.

Palavras chaves: hiperleptinemia, leptina, glândulas salivares

Changes in salivary glands caused by hyperleptinemia in animal model

Abstract

In recent years there some studies suggested an involvement of peptides and hormones in the regulation of salivary secretion. Leptin is a peptide encoded by the ob gene responsible for inducing satiety.

It is unknown whether the action of leptin in the salivary glands is direct or indirect, but the existence of receptors for this peptide in the salivary glands points towards a possible direct regulation of the glands by the leptin.

This work aimed to evaluate the existence of changes in the salivary glands induced by high levels of circulating leptin. Decreases in the areas of serous acini and increases in the enzymatic activity of amylase in hyperleptinemic individuals have been observed. Expression of leptin receptors was increased in the submandibular glands of the animals to which leptin was administered. Thus, hyperleptinemia causes changes in salivary glands, indicating a possible role of leptin in the regulation of these structures.

Keywords: Hyperleptinemia, Leptin, Salivary Glands

I. Fundamentos Teóricos

1.1. Secreção salivar

1.1.1. Saliva

A saliva é um fluido aquoso, hipotónico e transparente, segregado pelas glândulas salivares. O seu maior componente é a água, que chega a representar mais de 99% do total, sendo o restante constituído por componentes orgânicos e minerais (Dawes, 1993; Pederson *et al.*, 2009). A saliva mista ou total é a designação que recebe o fluido que se encontra na cavidade oral. Este é constituído por uma secreção mucoserosa ligeiramente ácida, (pH aproximadamente 8,9 em ratos) (Picco *et al.*, 2008), sendo composta por uma mistura complexa de fluidos provenientes das glândulas salivares maiores, de glândulas salivares menores e do fluido gengival, contendo ainda microrganismos orais e detritos de alimentos (Humphrey *et al.*, 2001). Este fluido contempla, na sua composição, uma variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato, fosfatos), proteínas, como imunoglobulinas e mucinas (glicoproteínas envolvidas na proteção e prevenção da desidratação oral, do epitélio gastrointestinal, bem como na emulsão de alimentos sólidos e combate a microorganismos), enzimas (nomeadamente amilase e lisozima) e produtos nitrogenados, como ureia e amónia (Smith *et al.*, 2009).

A saliva tem papéis importantes não só para o meio oral como também para o próprio organismo. Apresenta várias funções, entre as quais a ação física de limpeza que realiza na cavidade oral. É ainda responsável pela lubrificação dos tecidos, permitindo a vocalização, a alimentação e a deglutição. Atua também como protetora do esmalte e da mucosa oral. Outra das propriedades da saliva é a ação tampão que regula o pH da maioria das superfícies da cavidade oral (Lamont *et al.*, 2006; Areias, 2011), tendo também funções digestivas (Kruse *et al.*, 2006).

O estudo da saliva tem vindo a ganhar interesse, ao longo das últimas décadas, pelo potencial deste fluido como fonte não invasiva de biomarcadores de estados patológicos e fisiológicos. Este fluido apresenta a grande vantagem de ser obtido de forma não-invasiva, o que o torna preferido em relação a outros fluidos biológicos, como soro e plasma (Hu *et al.*, 2005; Soo-Quee *et al.*, 2007). A análise global de proteínas salivares, tem sido muito utilizada para o estudo da saliva,

utilizando técnicas de proteômica, que permitiram a identificação de novas proteínas e a avaliação de alterações nos níveis destes compostos orgânicos em diferentes estados fisiológicas ou patológicos, melhorando assim o conhecimento da fisiologia oral. Desta forma, mais de 1000 proteínas e péptidos salivares foram identificados (Ghafouri *et al.*, 2003; Harthoorn *et al.*, 2008). A composição da saliva é afetada por uma diversidade de fatores: ritmo circadiano (aumento durante o dia e uma diminuição durante a noite chegando a valores próximos a zero), exercício e gênero (Dawes, 1972). Existe uma relação mútua entre a secreção da saliva e a composição da própria dieta. O tipo de alimento não só influencia a forma como a saliva é produzida e a sua composição, como a saliva, por sua vez, interfere na percepção sensorial dos alimentos (Cook *et al.*, 1996; Matsuo, 2000; Humphrey *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002). A secreção salivar também pode sofrer alterações com estados patológicos como a diabetes, onde o fluxo salivar é diminuído causando a xerostomia e onde a composição proteica foi referida como estando alterada (Caseiro *et al.*, 2013).

Assim, e dado o relevo do estudo deste fluido, a compreensão da regulação da secreção salivar é de grande importância.

1.1.2. Glândulas Salivares

A saliva é maioritariamente produzida por três pares de glândulas salivares maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais. Por outro lado, existem ainda numerosas glândulas salivares de menores dimensões, localizadas principalmente na mucosa bucal e na língua (Catalán *et al.*, 2009).

Em termos histológicos, as glândulas salivares são compostas por células acinares (serosas e/ou mucosas), sistema de ductos e células mioepiteliais (Cook *et al.*, 1994).

As glândulas parótidas são compostas exclusivamente por células serosas, que contêm grânulos de secreção ricos em proteínas, nomeadamente alfa-amilase (responsável pela hidrólise do amido presente nos alimentos). São responsáveis ainda pela secreção de algumas imunoglobulinas importantes na defesa contra agentes patogénicos da cavidade oral (Guebur *et al.*, 2004). As células acinares serosas, apresentam-se como células piramidais, com um núcleo esférico na base, citoplasma ligeiramente basofílico e grânulos secretores na superfície apical. As glândulas parótida encontram-se localizadas anteriormente ao ouvido, de cada lado

da cabeça, estando intimamente associadas aos ramos periféricos do nervo facial (Guebur *et al.*, 2004). A parótida é enervada por componentes do sistema nervoso simpático e parassimpático (Moore, 1992). Quanto às glândulas submandibulares, são compostas por células acinares serosas e mucosas. As primeiras, em maior número, são semelhantes às descritas para as parótidas. Por seu lado, os ácinos mucosos apresentam células mais colunares, com núcleos mais achatados e localizados na base da célula.

As glândulas sublinguais são maioritariamente mucosas apesar de apresentarem meias-luas serosas a rodear os ácinos mucosos, o que as torna glândulas mistas. Estão localizadas imediatamente abaixo da mucosa do pavimento bucal (Guebur *et al.*, 2008). Estas glândulas apresentam uma enervação parassimpática e simpática (Moore, 1992).

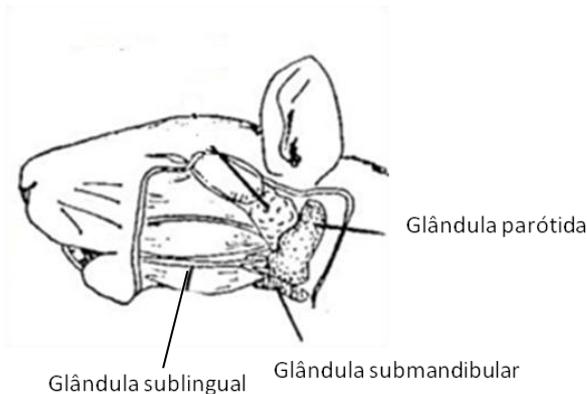


Figura 1. Localização e estrutura das principais glândulas salivares de rato (adaptado de Saliva and Salivary Glands www.dentistry.leeds.ac.uk)

Os ácinos segregam o seu conteúdo para os ductos que se vão dividindo e aumentando até chegarem à cavidade oral, pela ordem: ductos intercalares, ductos granulares (no caso particular das glândulas submandibulares de roedores), ductos estriados e ductos excretores, levando as glândulas salivares a apresentarem a forma de uma estrutura ramificada (Figura 2) (Wang *et al.*, 1994). Durante a passagem da saliva através deste sistema de ductos, a sua composição em eletrólitos e algumas proteínas é modificada, enquanto o volume permanece inalterado (Humphrey *et al.*, 2001). Os ductos salivares também têm recebido considerável atenção experimental, mas o seu funcionamento não está tão bem compreendido como o dos ácinos (Cook *et al.*, 1994; Cook *et al.*, 1998).

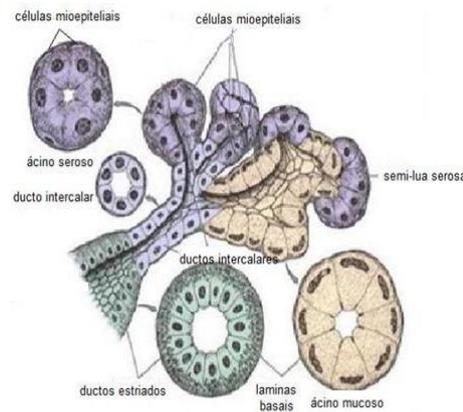


Figura 2. Constituição histológica das glândulas salivares
(adaptado de <http://www.sistemanervoso.com>)

Tal como referido, os roedores apresentam ainda os ductos granulares ou túbulos granulares contornados (*granular convoluted tubule*), os quais são característicos das glândulas submandibular destas espécies. Estes apresentam um elevado conteúdo em grânulos, não sendo encontrados em humanos nem em muitas outras espécies (Danz *et al.*, 1999). As células destes túbulos são reguladas por hormonas da hipófise e produzem e segregam um grande número de polipéptidos biologicamente ativos, como fator de crescimento epidérmico e fator de crescimento nervoso (Kurabuchi *et al.*, 2009). Estes túbulos contornados são responsáveis pela existência, por exemplo, no murganho, de um evidente dimorfismo sexual, caracterizado por um maior desenvolvimento nos machos (Taga *et al.*, 1997).

As contribuições percentuais das diferentes glândulas salivares durante o fluxo salivar não estimulado são as seguintes: 20% da parótida, 65% da submandibular, 7% a 8% da sublingual, e menos que 10% das inúmeras glândulas menores. Contudo, ao existir um estímulo, estas taxas de fluxo podem mudar drasticamente, tal como as contribuições relativas de cada glândula, sendo que a parótida pode chegar a contribuir com mais de 50% para a secreção salivar total (Humphrey *et al.*, 2001).

1.1.3. Regulação da secreção salivar

A estimulação para a produção da secreção salivar, ao nível dos três pares de glândulas salivares maiores, tem sido referida como sendo quase da exclusividade dos dois ramos do sistema nervoso autónomo (simpático e parassimpático). O efeito destes dois ramos difere consoante o tipo de células glandulares (ácinos ou ductos). Tanto o simpático como o parassimpático estimulam a secreção, ainda que a ação parassimpática esteja principalmente associada à produção de grandes quantidades de fluido, e a ação simpática à síntese e secreção de proteínas (Emmelin, 1987).

Os estímulos que afetam a secreção de saliva podem ser intra-orais, como é o caso do gosto, ou extra-orais, como os fatores ambientais, odor ou mesmo fatores psíquicos, não relacionados com a cavidade bucal (Christensen *et al.*, 1984; Matsuo, 2007).

Apesar de estar pouco compreendido de que forma as hormonas podem ter efeitos nas glândulas salivares, existem estudos que referem o seu envolvimento na regulação destas. Por exemplo, uma diminuição na produção de estrogénio, que ocorre em mulheres após a menopausa, leva a aumentos frequentes de boca seca (Eliasson *et al.*, 2003; Meurman *et al.*, 2009). Por outro lado, patologias associadas à diabetes, hipofisectomia, tireoidectomia, adrenalectomia e baixa hidratação, causam atrofia ao nível da glândula, levando a alterações no nível de volume de saliva produzido e da sua composição (Mahay, 2004; Murdoch *et al.*, 2011). Por outro lado, um aumento excessivo de produção de saliva, pode ser verificado durante a gravidez (Jenkins *et al.*, 1978).

Vários estudos mostram alterações na salivagem em situações de apetite ou saciedade. Ainda que nestes casos o sistema nervoso autónomo tenha um papel relevante na regulação, existem estudos que relatam que após a administração em ratos de hormonas como a secretina e a colecistocinina (CCK), a secreção por parte da glândula submandibular diminui (Takai *et al.*, 1998).

1.2. Leptina

1.2.1. Características e funções

A leptina é uma adipocitina derivada das citocinas, o início da sua descoberta foi conhecido por estar envolvida na regulação da ingestão de alimentos e gasto de energia (Dardeno *et al.*, 2010). A leptina funciona como um mensageiro que sinaliza a saciedade no hipotálamo, diminuindo assim a ingestão alimentar (Ribeiro *et al.*, 2013). O seu nome tem origem grega (leptos=magro) e está associado ao facto de induzir perda de peso. A leptina regula o armazenamento, o equilíbrio e o uso de energia pelo organismo. A partir da sua descoberta, a leptina tem sido objeto de um grande número de investigações, que vieram a revelar um complexo leque de funções e implicações desta hormona, muito para além do balanço energético e do peso corporal (Shánchez *et al.*, 2005).

A leptina (figura 3), é sintetizada como um péptido de 167 aminoácidos, com uma massa molecular de 14-16 KDa é composta por quatro hélices alfa (Shánchez *et al.*, 2005).

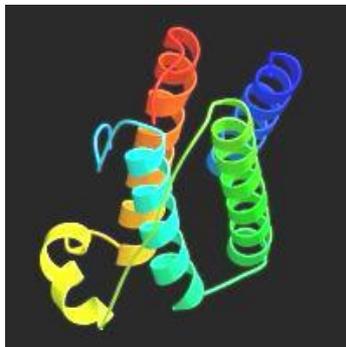


Figura 3. Estrutura da leptina

(adaptada: <http://www.obesos.org/articles/article10.html>)

A estrutura da molécula de leptina é muito similar entre as diferentes espécies, sendo que, por exemplo, a leptina humana apresenta uma homologia de 84% com a do rato. Após a sua produção, a leptina é libertada para a corrente sanguínea, sendo transportada até ao cérebro, onde estimula ou inibe a libertação

de vários neurotransmissores relacionados com a ingestão alimentar e estimula o dispêndio energético. Encontra-se na circulação sanguínea quer na sua forma livre, quer ligada a proteínas transportadoras. A sua semi-vida no plasma é de aproximadamente 25 minutos, no caso da endógena, e 90 minutos, para a exógena. A sua eliminação é feita sobretudo por via renal (Simón *et al.*, 2002).

A leptina é produzida principalmente no tecido adiposo, embora também possa ser encontrada, em níveis mais baixos, em outros tecidos, tais como estômago (mucosa gástrica), medula óssea, epitélio intestinal, placenta (em que funciona como fator de crescimento para o feto), no leite materno, músculo-esquelético e cérebro (Friedman *et al.*, 1998; Huo *et al.*, 2009)

A sua descoberta teve grande influência na compreensão acerca da comunicação do tecido adiposo com outros sistemas do corpo, em especial com o Sistema Nervoso Central (SNC) (Chapelot *et al.*, 2000; Negrão *et al.*, 2000). Para além deste papel ao nível da regulação do peso corporal, esta hormona é ainda responsável pela regulação da puberdade e da reprodução, da função placentária e fetal, da resposta imune e da sensibilidade do músculo (Fischer-Posovszky *et al.*, 2007). Defeitos genéticos que impliquem a ausência de leptina determinam, tanto em ratos, como em humanos, o aparecimento de obesidade mórbida precoce, que pode ser revertida com a administração da referida hormona (Sandoval *et al.*, 2003).

Até recentemente, o papel da sinalização da leptina no controlo do comportamento alimentar era entendida apenas em termos da influência exercida no controlo hipotálamico da fome e saciedade. No entanto, há evidências crescentes de que a leptina reduz o valor da recompensa de comida palatável por meio das suas ações na via dopaminérgica mesolímbica (Appelhans, 2010).

1.2.2. Mecanismos de ação – recetores de leptina

O recetor da leptina (Ob-R) foi identificado em 1995 por Tartaglia e colaboradores, utilizando leptina marcada, evidenciando a sua existência no plexo coróide do rato (Targalia *et al.*, 1995). Consiste numa proteína de membrana homóloga ao recetor da família das citocinas de classe I (George, 2008). Os Ob-R têm origem no gene db, sendo conhecidas seis isoformas (Ob-Ra a Ob-Rf) que têm em comum um domínio extracelular localizado no extremo amino terminal, diferindo na porção terminal carboxílica (Shánchez *et al.*, 2005) (Figura 4). Estes recetores têm três partes funcionais: a extracelular, que interage com a proteína (a leptina), e

que é idêntica a todas as isoformas dos recetores Ob-R; a transmembranar que serve para “ancoramento” do recetor à membrana celular; e a intracelular que, quando ativada, estimula os eventos celulares, em que o seu tamanho e seu domínio determinam a ação que a leptina exercerá sobre a célula alvo (Paracchini *et al.*, 2005).

Os recetores são encontrados na forma longa (Ob-Rb) e curta. A forma longa é encontrada no cérebro em diversas regiões do hipotálamo. A forma curta é encontrada nos demais tecidos (adiposo, gástrico, placenta, etc). Porém, em pequenas quantidades, também pode ser encontrado a Ob-Rb. (Banks, 2000; Shánchez *et al.*, 2005; Fruhbeck, 2006). A maior presença da isoforma Ob-Rb no hipotálamo, mais especificamente no núcleo hipotalâmico arqueado, indica a importante ação da leptina a nível desta estrutura, participando na homeostase energética. A isoforma Ob-Rb é totalmente funcional, sendo a única que conduz às cascatas de sinalização intracelular conhecidas. A sua presença foi também observada em tecidos periféricos, assim como em células hematopoiéticas e em todos os tipos de células do sistema imunológico, mas em menor quantidade (Kielar *et al.*, 1998).

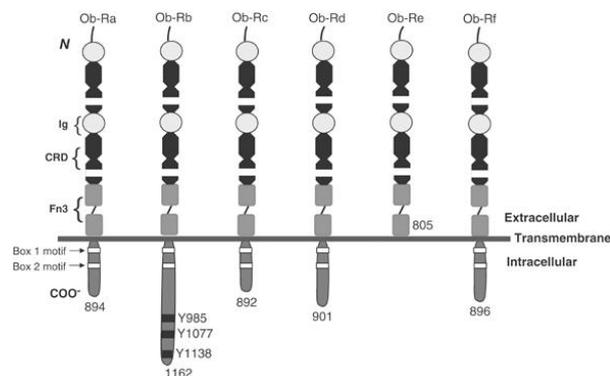


Figura 4. Representação esquemática da estrutura geral dos diferentes subtipos de recetores da leptina (ObR). O número total de resíduos de aminoácidos está indicado na parte inferior do esquema correspondente a cada subtipo

(adaptado de Shánchez *et al.*, 2005).

Descreveu-se que quando a leptina se une ao recetor Ob, esta forma dímeros (Figura 5) e transmite o sinal da leptina através das proteínas cinase JAK (*Janus Activated Kinases*) a três transdutores de sinal e ativadores da transcrição citosólicos (*STAT – Sinal Transducer 37 and Activators of Transcription*). As JAK associadas com o recetor induzem a fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) sobre

o domínio citoplasmático do recetor, criando locais de ligação da fosfotirosina para as proteínas STAT. Depois da fosforilação dos resíduos de tirosina das proteínas STAT, estas dissociam-se do recetor e formam os dímeros, para o qual contribuem os reguladores transcricionais ativos (George, 2008).

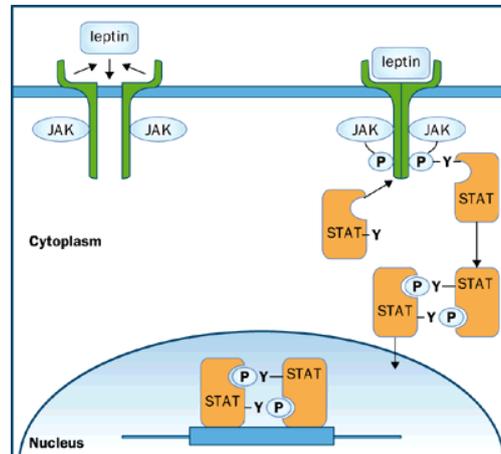


Figura 5. Efeito da união da leptina ao seu recetor (adaptado de Auwerx *et al.*, 1998).

1.2.3. Ação da leptina nas glândulas salivares

Ainda que o papel da leptina na secreção salivar não esteja bem compreendido, há estudos que apontam para uma potencial ação desta hormona ao nível das glândulas salivares.

Num estudo (Higa *et al.*, 2002), foi avaliado o papel da hiperleptinemia em glândulas salivares de rato, induzida por infusão de um adenovírus recombinante contendo o cDNA de leptina para rato (AdCMV-leptina). Quando comparado o peso das glândulas salivares dos indivíduos controlo (sem leptina) com os indivíduos hiperleptinémicos, foi observada uma redução do peso das glândulas, de cerca de 52%, destes últimos. Ainda que a leptina induza saciedade, os autores descartam outros efeitos, como alterações na taxa de mastigação, uma vez que esta foi controlada ao usar animais controlo que ingeriram apenas as quantidades de alimento equivalente à do grupo hiperleptinémico. Ainda que o motivo desta

alteração não tenha sido esclarecido, os autores sugerem possíveis ações da leptina ao nível do sistema nervoso autónomo.

Segundo Dall'Aglio *et al.* (2012) existem recetores de leptina funcionais nas glândulas salivares (verificadas através de técnicas imunohistoquímicas na glândula parótida de cavalos). A expressão destes recetores foi também descrita a nível das glândulas salivares de humanos (Matteis *et al.*, 2012). Apesar desta função não estar ainda completamente clarificada, esta presença sugere a possibilidade desta hormona influenciar a salivação.

Ao nível da língua a ação da leptina foi também descrita. Um subconjunto de células recetoras gustativas presentes no epitélio da língua foi afetado pela administração de leptina indicando que as células gustativas são mais um local periférico da ação desta hormona no trato gastrointestinal. A leptina suprime ainda as respostas nervosas gustativas para o estímulo doce em ratinhos (Kawai *et al.*, 2000). No entanto, a nível das glândulas salivares menores da língua não se encontrou bibliografia referindo a existência de recetores de leptina.

Não se sabe se a ação da leptina nas glândulas salivares é direta ou indireta (através de uma ação a nível do sistema nervoso central que se traduza por uma resposta conducente à ação do sistema nervoso simpático nas glândulas), mas a existência de recetores para este péptido nas glândulas salivares, aponta no sentido de uma possível regulação direta das glândulas por parte desta hormona (Gröschl *et al.*, 2011).

1.2.4. Função do enzima alfa-amilase

Em relação a uma das proteínas produzidas em maior quantidade na saliva, acabando por funcionar como um marcador do funcionamento das glândulas salivares serosas e seromucosas, a alfa-amilase desempenha a principal função no processo inicial da digestão, hidrolisando a ligação glicosídica alfa 1:4 entre as unidades de glucose na cadeia de polissacarídeos de amido. Os produtos finais da digestão da amilase são principalmente maltose. (Harris *et al.*, 1998).

A amilase salivar necessita de um meio cujo pH seja neutro (= 7). A atividade da α -amilase é dependente da ligação com iões de cálcio. No ensaio de cloretos, a α -amilase no reagente é desativada pela remoção de iões de cálcio com uma alta concentração de EDTA. A α -amilase desativada é reativada através da adição de iões cloretos da amostra, que permite que o ião cálcio se associe com o enzima. A

reativação da atividade α -amilase é proporcional à concentração de íons cloreto presente. A ligação do cloreto modula a atividade máxima e pH ótimo do enzima. O ambiente intestinal em que o enzima funciona é relativamente abundante em íons cloreto. Alguns fluidos que contribuem substancialmente com esses íons provêm do suco gástrico, bilis e excreções pancreáticas. (Maurus *et al.*, 2008).

II. Problemática

A estimulação da secreção salivar é quase da exclusividade dos dois ramos do sistema nervoso autónomo (simpático e parasimpático). No entanto, há estudos que mostram a influência de hormonas/péptidos na regulação da ação das glândulas salivares. A leptina é uma das principais hormonas envolvidas no balanço energético, induzindo saciedade. Há estudos que referem alterações na quantidade e composição de saliva produzida numa situação de saciedade, no entanto, é menos conhecida a influência da leptina na salivação. Adicionalmente, a expressão de recetores para esta hormona foi já observada a nível das glândulas salivares maiores, sugerindo que a mesma possa ter influência direta nestas.

Estudos recentes, com os animais usados no presente estudo, mostraram alterações na composição proteica da saliva induzida por hiperleptinemia. Assim, uma hipótese é que a leptina também provoque alterações histomorfológicas e na expressão de proteínas a nível das glândulas salivares.

III. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral avaliar os efeitos da hiperleptinemia a nível das glândulas salivares maiores e menores da língua, em modelo animal (rato).

3.2. Objetivos específicos

- 1- Avaliação de alterações histomorfológicas em glândulas salivares maiores e menores da língua, de forma a verificar se existe ou não alteração nos grupos em estudo;
- 2- Avaliação dos efeitos de hiperleptinemia na produção de amilase salivar, a nível das glândulas salivares maiores, quer em termos de expressão desta proteína, quer em termos da sua atividade enzimática, por diversas técnicas, como imuno-histoquímica, imunomarcação por Western blot e método de DNS;
- 3- Comparação dos níveis de expressão de recetores de leptina, nas glândulas salivares, maiores e menores da língua, entre indivíduos submetidos e não submetidos a hiperleptinemia, através de técnicas de imuno-histoquímica e imunomarcação por Western blot.

IV. Materiais e Métodos

4.1. Estratégia adoptada

A realização dos objetivos propostos para o presente trabalho, obedeceu ao seguinte plano:

a) Realização do trabalho

i) Local: Laboratórios de Bioquímica da Universidade de Évora, e Laboratório de Fisiologia Animal Aplicada, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Portugal.

ii) Tempo de duração – 9 meses

b) Modelo e características dos animais

i) Modelo animal – Ratos Wistar;

ii) Idade – 11-12 semanas ao início do ensaio;

iii) Critério de Seleção – género masculino;

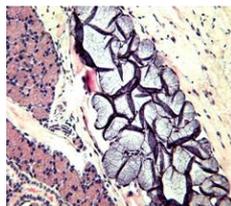
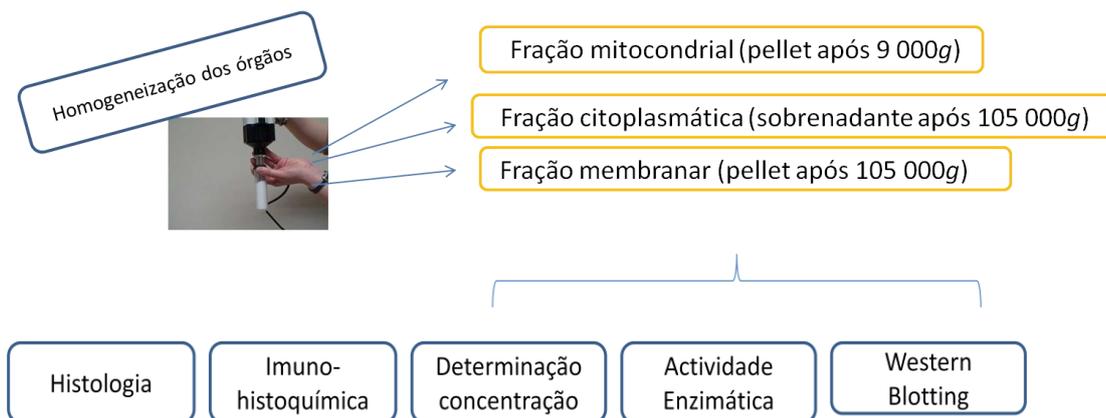
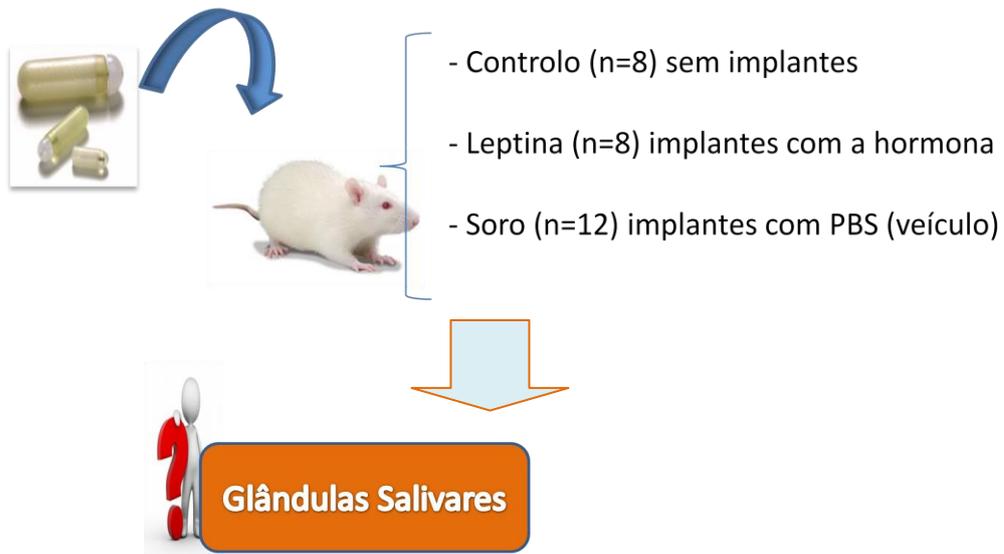
iv) Tratamento – implantes subcutâneos de libertação contínua, contendo leptina em tampão fosfato salino.

c) Amostras em estudo

Glândulas salivares parótidas e submandibulares/sublinguais, ultracongeladas (estes órgãos foram de imediato ultracongelados após a recolha, tendo apenas sido descongelados imediatamente antes da sua utilização).

Glândulas salivares maiores e línguas fixadas em formol (aquando da recolha) e posteriormente embebidas em parafina.

4.2. Organigrama



V. Materiais e métodos

5.1. Animais

Na realização do trabalho experimental foram utilizadas glândulas salivares maiores e menores da língua de 28 ratos Wistar machos, com 11 a 12 semanas. Previamente os animais foram divididos em três grupos: leptina (N=8), soro (N=12) e controlo (animais testemunha) (N=8). Aos animais pertencentes ao grupo leptina foram colocados implantes subcutâneos [bombas osmóticas (*mini pumps*), Alzet] contendo leptina na concentração de 0.2 µg/g peso vivo/dia, para cada rato em tampão fosfato (PBS) (veículo de administração), os quais permaneceram durante 7 dias. Os animais pertencentes ao grupo denominado “soro” sofreram o mesmo procedimento cirúrgico, com colocação do mesmo tipo de implantes, sendo cheios unicamente com PBS. Os animais controlo foram animais usados como testemunha, sofrendo o mesmo tipo de manejo experimental (tipo de acondicionamento, pesagens diárias, etc.), mas sem serem intervencionados cirurgicamente para administração de qualquer tipo de composto. No final dos 7 dias de ensaio, os animais foram anestesiados e eutanasiados por punção cardíaca. As glândulas salivares maiores foram extraídas, sendo uma parte de cada uma delas processada para histologia e a outra parte foi congelada em azoto líquido e mantida a -80°C para posterior análise laboratorial de parâmetros bioquímicos. As línguas também foram extraídas para processamento histológico. Neste caso não foi extraída nenhuma parte para análise de parâmetros bioquímicos, dada a necessidade da língua completa para análise de outros parâmetros fora do âmbito do presente trabalho.

Os animais foram monitorizados, diariamente, em termos de pesos e consumos de alimento. Os pesos médios à data de início de ensaio (colocação de implantes) eram de 369.1 ± 2.8 g, 365.5 ± 7.1 g e 374.2 ± 8.9 g, para os grupos leptina, soro e controlo, respetivamente. No final do ensaio os mesmos eram de 366.9 ± 2.9 g, 371.8 ± 6.0 g e 372.5 ± 8.2 g, para os grupos pela mesma ordem. Os pesos não diferiram entre os grupos em estudo, em nenhum ponto do ensaio. No que diz respeito ao consumo de alimento, os animais apresentavam valores semelhantes antes da colocação dos implantes, tendo-se assistido a um decréscimo significativo dos consumos do 1º ao 3º dia após colocação das *mini pumps*. Nessa altura, os animais submetidos ao tratamento com leptina apresentavam consumos

significativamente mais baixos que os animais dos outros grupos (7.8 ± 0.2 g, 8.8 ± 0.3 g e 8.2 ± 0.2 , para leptina, soro e controlo, respetivamente). A partir daí e até ao final do ensaio, deixaram de se observar diferenças entre grupos, em termos de consumos (6.6 ± 0.3 g, 6.5 ± 0.3 g e 6.2 ± 0.2 g, para os grupos da leptina, soro e controlo, respetivamente). No final do ensaio os animais utilizados no presente estudo apresentavam os seguintes níveis plasmáticos de leptina: controlo = $99,5 \pm 14,5$ ng/dL; soro = $62,1 \pm 11,7$ ng/dL e leptina = $257,4 \pm 30,9$ ng/dL (média \pm erro padrão).

5.2. Histologia

As glândulas salivares maiores e as línguas foram removidas e fixadas em em formaldeído neutro a 10%, tamponado (pH 7.4), durante 24 horas, realizando-se de seguida o processamento pelas técnicas histológicas de rotina, em sistema automático: inclusão em parafina e corte em micrótomo rotativo, em secções com 5 μ m 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 e Periodic Acid-Schiff (PAS), para detecção de mucinas neutras e polissacarídeos simples.

As secções das glândulas salivares foram observadas através de microscopia fotónica com um microscópio fotónico Leitz-Dialux 20, equipado com máquina fotográfica digital, com uma ampliação de 250X. Para cada animal foram tiradas várias fotomicrografias, de áreas escolhidas aleatoriamente, de cada uma das glândulas salivares, tendo estas sido observadas e fotografadas com uma ampliação 250x. Para cada animal, as áreas e os perímetros foram medidos (cerca de 30 ácinos por animal) através do software SigmaScan Pro 5.0 (SPSS, Chicago, USA). Apenas as estruturas histológicas cujos limites eram claramente definidos foram consideradas na medição.

Todos os dados histomorfométricos foram analisados estatisticamente. A normalidade e homocedasticidade foram testadas através dos métodos de Kolmogorov-Smirnov and Levene. No nosso caso, não se verificaram os pressupostos portanto efectuaram-se testes não paramétricos Kruskal-Wallis, para avaliar a existência de diferenças entre os grupos no que diz respeito aos perímetros e áreas acinares. Os valores obtidos foram analisados estatisticamente, através da análise de variância (one-way ANOVA). As diferenças entre as médias

foram consideradas significativas para $P < 0,05$. Toda a análise estatística foi efetuada com recurso ao software SPSS.

5.2.1. Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada utilizando os anticorpos primários contra a α -amilase e o recetor de leptina, 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 1).

Tabela 1. Anticorpo utilizado na marcação imuno-histoquímica

Anticorpo	Fonte	Referência	Diluição	Incubação
Amilase (G-10)	Santa Cruz Biotechnology	sc-46657 (<i>mouse monoclonal</i>)	1:500	60 min, temperatura ambiente
Recetor leptina	Santa Cruz Biotechnology	SC-8391 (<i>mouse monoclonal</i>)	1:50	Overnight, 4°C

As secções de 5 μ m 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 H_2O_2 a 30%, para 9 partes de metanol absoluto), durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4), três vezes por dois minutos. Antes da incubação com o anticorpo primário, os cortes foram pré-tratados para recuperação antigénica¹, em

¹ A fixação em formalina promove ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com as proteínas adjacentes. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso de anticorpos aos epitopos alvo, mascarando o antigénio.

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, e de seguida foram incubados, em câmara húmida com o respetivo anticorpo primário. 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 a seguir 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 gradações de álcool, clarificados em xilol e montados com Entellan (Merck, nº. 107961). Para a interpretação dos resultados foi incubada secção adjacente como controlo negativo, sem o anticorpo primário.

Relativamente à expressão da α -amilase a e do recetor de leptina, as lâminas foram também examinadas em microscópio fotónico Leitz-Dialux 20, equipado com máquina fotográfica digital, com uma ampliação de 250X. Em que foram visualizadas todas as lâminas. A imunocoloração foi avaliada de forma qualitativa de acordo com a seguinte escala: - (negativo); + (imunomarcação fraca); ++ (imunomarcação moderada); +++ (imunomarcação forte).

5.2.1.1 Funcionamento da técnica

O mecanismo básico da imuno-histoquímica é o reconhecimento do antigénio a ser pesquisado por um anticorpo específico, associado a diversos tipos de processos de visualização. Cada anticorpo reconhece apenas um único antigénio, que pode ser, por exemplo, uma proteína de uma célula normal ou neoplásica ou de um microrganismo. A técnica usual utiliza um anticorpo secundário, que se liga ao anticorpo primário e é associado a um complexo de visualização (complexo avidina-biotina-enzima-cromogénio ou polímero com amplificação).

O cromogéneo mais utilizado é o DAB (diaminobenzidina) que confere cor castanha ao precipitado permanente, pelo que as áreas "positivas" coram de castanho e as "negativas", com o corante utilizado para contra-coloração, geralmente a hematoxilina, de azul. Atualmente existe um grande número de anticorpos primários disponíveis comercialmente para uso em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, permitindo a sua análise imuno-histoquímica.

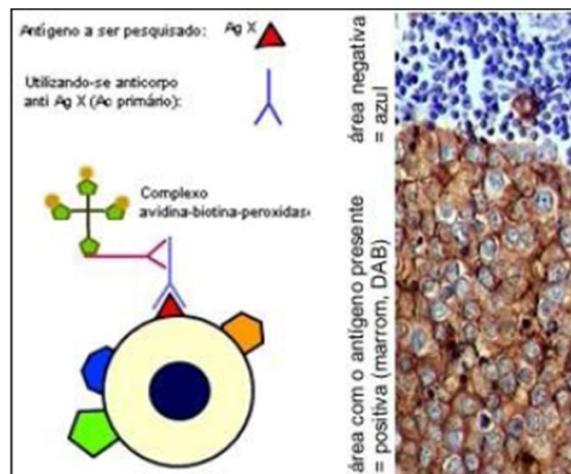


Figura 6. Mecanismo básico da imuno-histoquímica
(adaptado de <http://www.fontemd.com.br/ihq.html>)

5.3. Análise bioquímica das frações subcelulares das glândulas salivares maiores

5.3.1. Separação das frações subcelulares das glândulas parótidas e submandibulares/sublinguais

Em primeiro lugar descongelaram-se os órgãos em gelo. O procedimento foi feito em separado para as glândulas parótidas e submandibulares/sublinguais de cada indivíduo. Dada a dificuldade em isolar as glândulas sublinguais das submandibulares as mesmas foram tratadas em conjunto. Com o auxílio de pinça e tesoura, partiu-se o órgão em pequenos fragmentos e colocaram-se os mesmos no copo próprio do homogeneizador (mantendo o copo sempre em gelo). Adicionaram-

se 2 mL de tampão de homogeneização (0,84g NaHCO₃ e 42,79g sacarose, num volume final de 500mL e ajustou-se a pH 7,0) com 2µl de PHSF (*phenylmethone sulfanyl fluoride*) (0,0871g PHSF em 5 mL de isopropanol) e homogeneizaram-se os fragmentos de órgão no homogeneizador. O homogeneizado foi passado através de um passador, deitando-se a fração líquida para um tubo de falcon previamente arrefecido. A fração sólida foi novamente misturada em 2 mL de tampão de homogeneização com PHSF e voltou-se a homogeneizar mais um pouco, juntando-se a nova fração líquida à já existente no tubo de falcon. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C, 10 minutos, 1200g e recolheu-se o sobrenadante, rejeitando-se o *pellet* (contendo células inteiras e núcleos). Voltou-se a centrifugar o sobrenadante a 4°C, 10 minutos, 9000g. Ressuspendeu-se o pellet em 0,5 mL de tampão de isolamento (27,384g sacarose, 0,1514g tris e 0,2979 Hepes em 250mL água e pH ajustado a 7,4) (a fração contém mitocôndrias e outros constituintes de densidade semelhante, sendo neste trabalho designado de fração mitocondrial), guardando-se em *ependorf*. Posteriormente, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 105000g (equivalente a 38000 rpm), 65 minutos, 4°C. Recolheu-se o sobrenadante guardando-se (fração citosólica); ressuspendeu-se o *pellet* em 0,5 mL de tampão de isolamento, com uma micropipeta sem criar bolhas (fração membranas) e colocou-se em *ependorf*. As frações foram armazenadas a -20°C até utilização.

5.3.2. Quantificação da proteína total pelo método de Bradford

A quantificação proteica, pelo método de Bradford, foi feita através da utilização do reagente de Bradford, preparado com Azul de Coomassie (100 mg de *Azul de Coomassie G-250* em 50 mL de etanol a 95%. Adicionou-se à solução 100 mL de ácido fosfórico a 85%. Diluiu-se para 1 L de água e filtrou-se).

Para traçar a curva de calibração, foram utilizadas concentrações de 25, 50, 100, 200, 350 e 500 µg/mL de albumina do soro bovino BSA (*Bovine Serum Albumin*), preparando-se inicialmente uma solução-mãe, com concentração de 2000 µg/mL, a partir da qual foram feitas as várias diluições.

As frações utilizadas, foram descongeladas, em gelo, diluídas 10X, 25X, 50X e 100X para as frações da glândula parótida e 10X, 50X, 100X e 200X, para as frações correspondente à glândula submandibular/sublingual. Foram aplicados 10µl de cada solução de BSA e de cada amostra, em triplicado, nos poços da microplaca. Posteriormente, adicionaram-se 200 µL do reagente de Bradford. Após incubação à

temperatura ambiente, durante 5 minutos, foram feitas as leituras das absorvências 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 absorvências de cada padrão em função da quantidade de proteína. Por interpolação, e tendo em conta o fator de diluição, calculou-se a quantidade de proteína para cada um dos triplicados das amostras.

5.3.3. Determinação da atividade Enzimática da amílase (método do DNS)

O método de determinação da atividade enzimática de amílase utilizado baseia-se na redução do reagente ácido dinitro-salicílico (DNS) pelos açúcares redutores que são produzidos em função da atividade enzimática da amílase (Miller, 1959). Para a realização deste método são usados reagentes como: solução de tártaro de sódio e de potássio que serve para prevenir o reagente da ação do oxigénio dissolvido, o fenol, que é utilizado para aumentar a quantidade de cor produzida; o hidróxido de sódio, um redutor da ação da glicose sobre o ácido dinitro-salicílico.

Ocorre no método do DNS a seguinte reação de oxidação/redução (Figura 7):

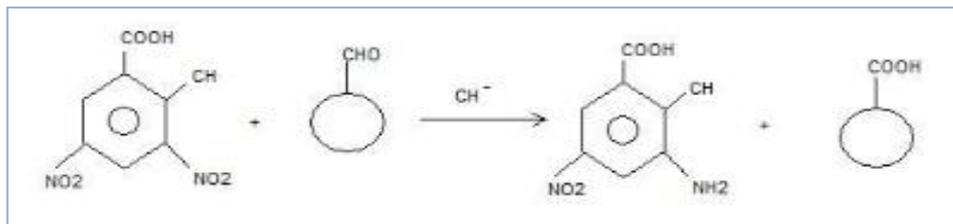


Figura 7. Reação de oxidação da carbonila, com redução do reagente DNS

Ocorre a redução do 3,5-di-nitrosalicitato (de cor amarelo forte) e a oxidação do monossacarídeo, a glicose, formando o 3-amino-5-nitro-salicilato (de cor laranja-castanho forte), na proporção estequiométrica.

Foi traçada uma curva padrão contendo glucose com as concentrações 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 e 5 µg/ml, respeitando a Lei de Beer. As diversas soluções

foram preparadas, por diluições sucessivas, a partir de uma solução “mãe” de concentração 9 mg/mL.

De forma a escolher as concentrações de cada uma das frações subcelulares a usar, de modo a que os valores “caíssem” numa zona linear da curva de glucose, foram testadas diversas concentrações para uma amostra de um animal do grupo controlo. Para a fração citosólica da glândula parótida, as quantidades de proteína (em µg) testadas foram de 1; 1,5; 2 e 2,5. Para a fração citosólica da glândula submandibular/sublingual, as quantidades testadas foram de: 2; 4; 6; 8; 10 e 12. Após análise das quantidades testadas, escolheu-se para a fração citosólica da parótida as quantidades de proteína de 0,25; 0,5 e 1 (estas quantidades não foram testadas, mas verificando se que apenas a quantidade de 1 µg recaia dentro dos valores obtidos na curva padrão, utilizou-se quantidades menores). Para a fração citosólica da submandibular as quantidades de 4; 6 e 8.

Tendo em conta a potencial presença de amilase na fração mitocondrial (Vitorino *et al.*, não publicado), estas foram analisadas em termos da atividade enzimática desta proteína. Para a fração mitocondrial da glândula parótida e submandibular as quantidades testadas foram de 5; 15; 25 e 35, de onde se escolheram as quantidades a aplicar de 15; 20 e 25. O ensaio foi iniciado. Em triplicado, adicionou-se em tubos de ensaio, 100µl de tampão fosfato de potássio 20mM, 100µl de solução de amido 1,0% (m/v), 50 µl de amostra (ou água, no caso branco). A mistura foi incubada durante 20 min a 37°C num banho com agitação. Após os 20 minutos (rigorosamente medidos) adicionou-se a solução de DNS tubo a tubo, tendo o cuidado de agitar em vortex de imediato e colocar no gelo. Em seguida colocou-se num banho fervente durante 5 minutos e voltou-se a colocar em gelo. Após 2-3 minutos adicionaram-se 208µl de solução de tartarato de sódio e potássio 40% (m/v) e 900µl de água destilada. Voltou-se a agitar no vortex e leram-se as absorvências a um comprimento de onda de 530 nm, num espectrofotómetro.

Tendo em conta que a fração citosólica correspondia ao sobrenadante obtido no passo de ultracentrifugação, e tendo em conta que a solução de homogeneização utilizada continha sacarose, um dos riscos era a existência de outros açúcares redutores, que não apenas os produzidos em resultado da ação da amilase sobre o amido. Ainda que a sacarose seja um açúcar não redutor, a presença de glucose resultante de alguma degradação desta não era de excluir. Assim testámos o protocolo com a amostra com o enzima ativo e sem este ter ação. Este último passo foi conseguindo saltando o passo de incubação do enzima a 37°C, e passando imediatamente para a adição de DNS e incubação a 100°C. Este “branco” não foi feito sem a adição de saliva (contendo o enzima), pois não era

possível excluir a presença de amilase sem excluir os outros componentes da saliva. Para a fração mitocondrial testou-se a necessidade de utilização deste “branco”, concluindo-se não ser necessário, pois os valores de absorvência obtidos para o protocolo com o enzima inativo correspondiam aos valores do branco (preparação não contendo amostra).

5.3.4. Determinação da expressão proteica por Western Blotting

Para a realização da electroforese SDS-PAGE (dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida) foram preparados géis de 8 x 10 cm e 0,5 mm de espessura. Para a imunomarcção com anticorpo anti alfa-amilase (nas frações citosólica e mitocondrial da glândula salivar parótida) foram usados géis de resolução de 12% [2,5mL de Tris-HCl 1.5M, pH 8.8, 100 µl de SDS 10% (m/v), 4mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 3,4mL de água bidestilada, 75µL de APS (Ammonium Persulfate) 0,1 g/mL e 5µl de TEMED, para um volume final de 10,8 mL]. Para a imunomarcção com anticorpo primário anti-recetores de leptina (na fração membrana das glândulas parótida e submandibular), os géis de resolução utilizados foram géis de 7,5% de acrilamida [2,5mL de Tris-HCl 1.5M, pH 8.8, 100 µl de SDS 10% (m/v), 2,5mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 4,9mL de água bidestilada, 75µL de APS (Ammonium Persulfate) 0,1 g/mL e 5µl de TEMED, para o volume final de 10,8 mL].

Estas diferenças no tipo de gel de resolução usado deveram-se às diferentes massas moleculares das duas proteínas de interesse. O objetivo foi ter géis em que essas zonas de massas moleculares ficassem bem resolvidas.

O gel de concentração usado foi sempre um gel com 4% acrilamida, [1mL de Tris-HCl 0,5, pH 6.8, 40µL de SDS 10% (m/v), 2,43mL de água bidestilada, 0,53mL de acrilamida/bis-acrilamida 30% (m/v), 24µL de APS e 4,4µL de TEMED, no volume final de 8,4 mL].

Após a polimerização, os géis foram colocados no sistema Protean mini (Bio-Rad). Ambos os reservatórios (superior e inferior) foram cheios 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; 2% SDS (v/v); 5% 2-mercaptoetanol, 20% glicerol; vestígios de azul de bromofenol], incubadas num

banho seco a 95°C, durante 5 minutos, e imediatamente colocadas em gelo, seguindo-se a sua aplicação nos poços do gel. Uma vez que não encontramos estudos que nos pudessem ajudar a saber as quantidades de proteína total a aplicar para conseguir obter marcação com os anticorpos usados, testámos diferentes quantidades de proteína para cada uma das frações e em função do tipo de anticorpo primário a usar. Sendo assim, para posteriores marcações com o anticorpo anti alfa-amilase, as quantidades de proteína testadas (em µg) foram de 10; 6; 5; 4; 3; 2; 1, para a fração citosólica e de 50; 40; 30; 20; 15; 10; 6; 3, para a fração mitocondrial. Para posterior marcação com anticorpo anti-recetores de leptina, as quantidades de proteínas utilizadas para aferição da quantidade a aplicar foram de (em µg) 115; 100; 75; 50 e 25, para a fração membrana das glândulas submandibular/sublingal e de 25; 20; 15 e 10 para a fração membrana das glândulas parótida. Com base nos resultados de aferição, usaram-se para avaliar a expressão da alfa-amilase, as quantidades de 40 µg de proteína total, na fração mitocondrial e a quantidade de 6 µg na fração citosólica (não foram quantidades testadas, pois teve-se em conta ajustes em relação a quantidade de amostra e à quantidade a colocar em cada poço). Já para avaliar a expressão dos recetores de leptina, as quantidades utilizadas foram de 90 µg de proteína total para a glândula submandibular e de 33 µg para a parótida. Num dos poços de cada um dos géis foram aplicados 5 µL de um marcador de massas moleculares (Dual Color Standards, da Bio.Rad). As proteínas foram separadas a uma voltagem constante de 140 V (60 mA e 15 Watt). A corrida electroforética decorreu até a frente de corrida atingir o final do gel.

Antes de iniciar a transferência das proteínas do gel para a membrana de PDVF (Hybond, GE Healthcare), a mesma teve que ser ativada, o que consistiu em colocá-la 5 segundos numa solução de metanol, seguindo-se de 5 minutos em água destilada. Posteriormente preparou-se a *sandwich*, com gel e membrana, por cima da superfície preta 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 8). Todos estes componentes foram cuidadosamente colocados dentro de tampão de transferência [Tris-HCl 25mM, pH 8.3; glicina 192mM; metanol 20%; SDS 0,037% (m/v)], evitando-se a formação de bolhas de ar que pudessem diminuir o contacto entre o gel e a membrana. Fechou-se firmemente a cassette, tendo o cuidado de não mover a *sandwich* do gel e do papel de filtro.

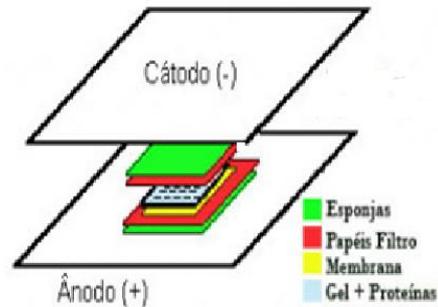


Figura 8. Representação esquemática da *sandwich* utilizada para a transferência de proteínas do gel de electroforese para a membrana.

Colocou-se a cassete no módulo, juntou-se a unidade de arrefecimento e encheu-se completamente o reservatório com o tampão de transferência. A transferência ocorreu a uma corrente constante de 350 mA; 150 V; 40 W durante 1 hora. Após a transferência a membrana foi mergulhada numa solução corante Ponceau S (0,2g de ponceau, 3mL de ácido acético, para um volume final de 100mL) durante 5 minutos, com agitação suave, seguida de lavagens em várias passagens com água destilada à temperatura ambiente. Esta coloração teve como objetivo visualizar a presença das bandas proteicas, confirmando o sucesso da transferência e ajudar a aferir a quantidade de proteína total aplicada em cada poço do gel SDS PAGE.

Este procedimento foi feito com o anticorpo primário anti alfa-amilase e anti-receptores de leptina. As membranas correspondentes às amostras da fração membranar foram cortadas numa zona de massas moleculares ligeiramente superiores a 50 kDa, de modo a que metade da membrana fosse incubada com anticorpo primário anti-receptores de leptina e a outra metade com anticorpo primário anti beta-actina. A proteína beta-actina foi usada como marcador interno da quantidade de proteína aplicada, visto ser uma proteína cujas quantidades se mantêm relativamente constantes para a mesma quantidade de proteína total aplicada.

Após o passo de coloração com o Ponceau S (cuja ligação do corante às proteínas é reversível), colocou-se a membrana na solução de bloqueio TBS-T (Tris-

HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) suplementado com 5% (m/v) leite magro durante 2h à temperatura ambiente com agitação suave. Posteriormente, procedeu-se a 3 lavagens de 15 min cada com solução de TBS-T com 0,5% (m/v) de leite em pó, e incubou-se a membrana com o anticorpo primário específico para cada marcação [amílase (SC-46657 mouse monoclonal IgG2 da Santa Cruz; diluição 1:200), Ob-R (SC-8391 mouse monoclonal IgG1 da Santa Cruz; diluição 1:200) e beta-actina (SC-47778 mouse monoclonal IgG1 da Santa Cruz; diluição 1:200), *overnight*, a 4°C. Foram realizadas novamente 3 lavagens (as lavagens foram feitas sempre com agitação suave). Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo secundário (anti-mouse; diluição 1:10000) à temperatura ambiente durante 2h, com agitação, seguida de três lavagens, de 15 minutos cada, em solução de lavagem.

Por fim a membrana foi revelada com TMB (Sigma), colocando algumas gotas do substrato sobre a membrana aguardando-se até o surgimento da marcação. Após estas, as membranas foram lavadas com água ultrapura e digitalizadas num scanner. A intensidade de marcação foi comparada entre os grupos através de análise feita com recurso ao software GelAnalyser.

V. Resultados

6.1. Histologia

6.1.1. Comparação histomorfométrica dos ácinos das glândulas salivares maiores e menores da língua

Quanto à análise dos ácinos serosos das glândulas menores da língua, observamos que relativamente aos grupos estudados (controlo, soro e leptina) existem diferenças significativas para as áreas (pixéis) e perímetros (pixéis), obtendo-se valores inferiores nos animais que estiveram sujeitos aos implantes com a leptina. As diferenças em termos de área são entre os grupos controlo e leptina ($P=0,000$) e entre os grupos soro e leptina ($P=0,000$). Os grupos controlo e soro não diferem entre si ($P=0,514$). O mesmo acontece relativamente aos perímetros, com valores menores para o grupo leptina relativamente aos grupos controlo e soro ($P=0,000$), sem diferenças entre controlo e soro ($P=0,564$) ($71416,7 \pm 1575,0$; $72863,4 \pm 1468,2$ e $55797,1 \pm 1424,9$; média \pm erro padrão para controlo, soro e leptina, respetivamente) (Figura 9).

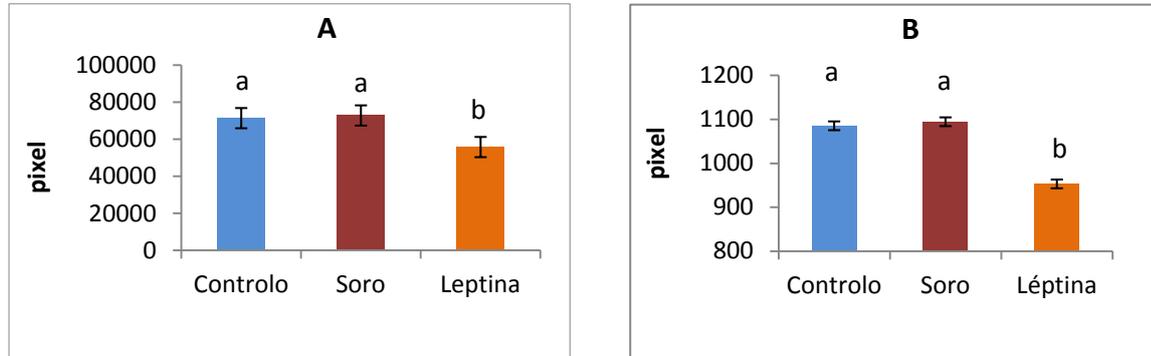


Figura 9. Valores de áreas (A) e perímetros (B) (média \pm erro padrão) dos ácinos serosos da língua. Letras diferentes significam diferenças entre grupos. $P < 0,05$

Quanto à análise relativa aos ácinos mucosos das glândulas salivares menores da língua, obtiveram-se diferenças significativas entre os três grupos quer para a área (pixéis) quer para o perímetro (pixéis) ($P=0,000$), também com o grupo submetido a hiperleptinemia apresentando valores mais baixos que os restantes. Neste caso, o grupo do soro também apresenta valores mais baixos que o grupo controlo ($58862,2 \pm 1016,5$; $47047,5 \pm 823,1$ e $41838,2 \pm 983,8$; média \pm erro padrão para controlo, soro e leptina, respetivamente) (Figura 10).

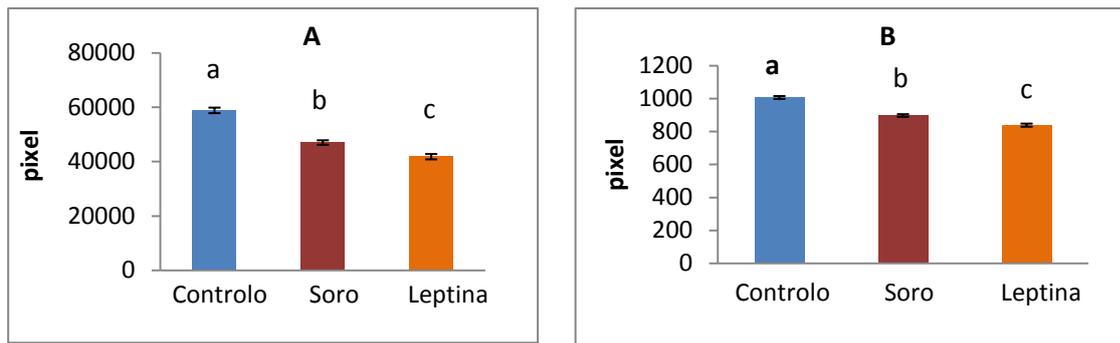


Figura 10. Valores de áreas (A) e perímetros (B) (média \pm erro padrão) dos ácinos mucosos da língua. Letras diferentes significam diferenças entre grupos. $P < 0,05$

Quanto às glândulas salivares maiores, observaram-se diferenças significativas entre os grupos experimentais a nível das áreas (pixéis) e perímetros (pixéis) dos ácinos serosos das parótidas. As diferenças observaram-se entre os três grupos sendo o controlo o que apresentou maiores valores de áreas e perímetros, seguindo-se o grupo ao qual foi administrado o veículo (soro). O grupo que recebeu leptina é o que apresenta áreas e perímetros inferiores (Figura 11). As diferenças são significativas entre os grupos controlo e soro ($P=0,000$) e leptina e soro ($P=0,000$) e entre os grupos controlo e leptina ($P=0,032$) ($38631,0 \pm 1081,7$; $34842,6 \pm 929,5$ e $28899,9 \pm 875,5$; média \pm erro padrão para controlo, soro e leptina, respetivamente).

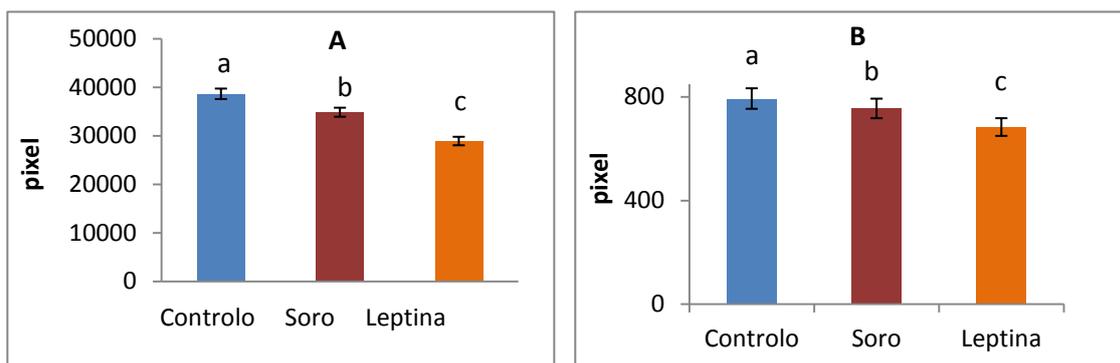


Figura 11. Valores de áreas (A) e perímetros (B) (média \pm erro padrão) dos ácinos serosos das glândulas parótidas. Letras diferentes significam diferenças entre os grupos. $P < 0,05$

Em relação à glândula submandibular, foram medidos os ácinos seromucosos não se tendo observado diferenças significativas entre os grupos, nem para as áreas (pixéis) nem para os perímetros (pixéis). Controlo e soro ($P=0,365$), leptina e soro ($P=0,564$) e entre os grupos controlo e leptina ($P=0,514$) ($45598,9 \pm 1341,1$; $47365,8 \pm 1185,9$ e $47607,8 \pm 1538,2$; média \pm erro padrão para controlo, soro e leptina, respetivamente) (Figura 12).

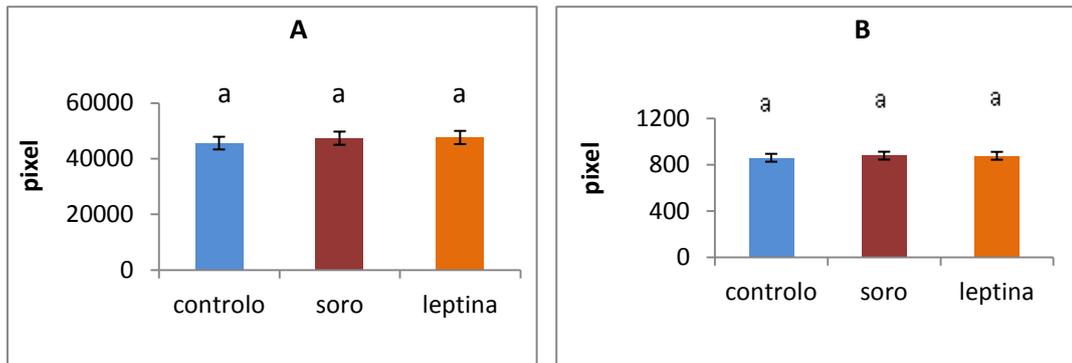


Figura 12. Valores de áreas (A) e perímetros (B) (média \pm erro padrão) dos ácinos seromucosos da glândula submandibular.

Ao nível das glândulas submandibulares, foram ainda medidas as áreas (pixéis) dos ductos granulares dos animais do grupo leptina e soro, de forma a verificar se existiam diferenças ao nível da área total ocupada. Tendo em conta que nos cortes histológicos os ductos podem ser seccionados transversal ou longitudinalmente, e tendo em conta que isso resulta em áreas e perímetros muito diferentes, para avaliar alterações no tamanho destas estruturas, optou-se por avaliar o total de área ocupada pelos mesmos, em diversas fotomicrografias (tiradas em diversas zonas diferentes), comparando-se esses valores entre os grupos. Observaram-se valores de área total ocupada significativamente superiores no grupo de animais hiperleptinémicos ($542402 \pm 34811,0$ e $709163,4 \pm 56090,3$; média \pm erro padrão para soro e leptina, respetivamente). (Figura 13).

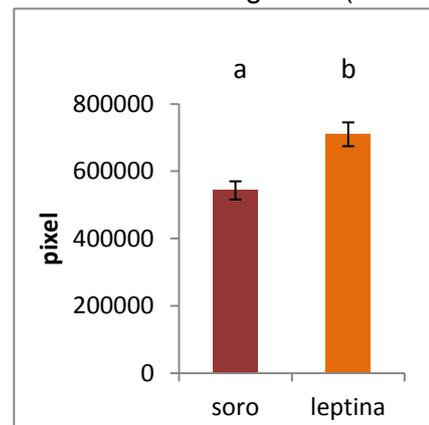


Figura 13. Medição de áreas de ductos da glândula submandibular (média \pm erro padrão) Letras diferentes significam diferenças entre os grupos. $P < 0,05$

Para esta comparação da histomorfométrica dos ácinos das glândulas salivares maiores e menores da língua os valores obtidos encontram-se no (Anexo 1).

6.1.2. Avaliação imunohistoquímica da expressão de alfa-amilase e recetor de leptina

Amilase salivar

O objetivo da utilização desta técnica foi a de avaliar a expressão da alfa-amilase ao nível das glândulas salivares maiores (submandibular e parótida) e ao nível das glândulas salivares menores das línguas. Através desta marcação não se observaram diferenças, na expressão da amilase entre os grupos (Tabela 2 e Figura 14).

Tabela 2. Intensidade de coloração para a alfa-amilase nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores¹

Glândula	Estruturas	Controlo	Soro	Leptina
Parótida	Ácinos	++	++	++
	Ductos estriados	-	-	-
Submandibular	Ácinos	-	-	-
	Ductos granulares	+	+	+
	Ductos estriados	±	±	±
Glândulas menores da Língua	Ácinos	++	++	++
	Ductos	-	-	-

¹ - (negativo); ± (imunomarcação focal); + (imunomarcação fraca); ++ (imunomarcação moderada); +++ (imunomarcação forte).

Pela observação das imagens da (Figura 14) é evidente o facto de que é na glândula parótida que a expressão da amilase é mais intensa, mais especificamente no citoplasma das células acinares. Quanto aos ductos, a expressão é quase inexistente. Na glândula submandibular a expressão da amilase verifica-se apenas nos ductos granulares, não se observando diferenças entre os grupos. Quanto à

língua é nos ácinos que a marcação é mais intensa. Não se verifica aparentemente diferenças entre os grupos.

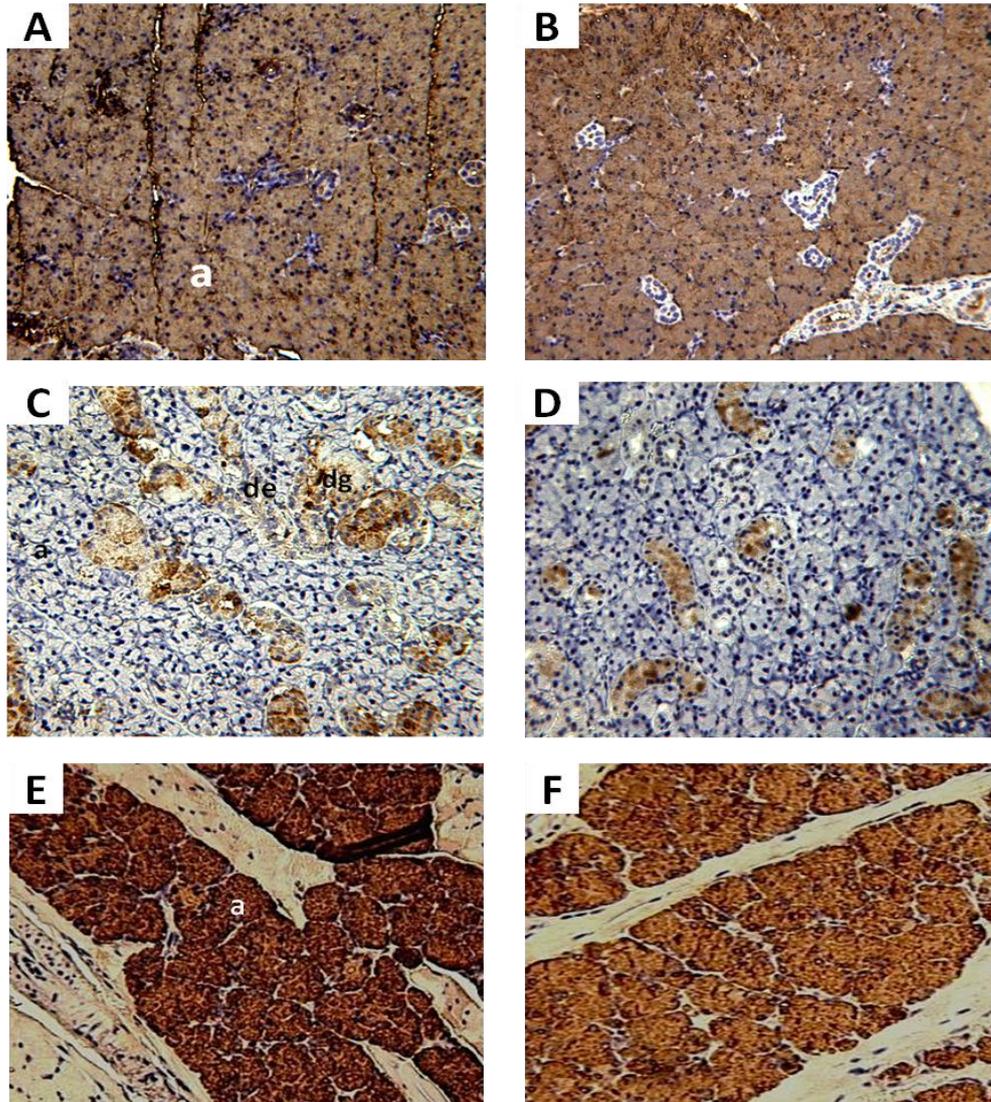


Figura 14. Imunomarcção para a alfa-amilase, evidenciada pela cor castanha nas glândulas salivares maiores. A (parótida soro); B (parótida leptina); C (submandibular soro); D (submandibular leptina); E (língua soro); F (língua leptina). a- ácino; dg- ducto granular; de- ducto estriado. Ampliação de 250X.

Recetores de leptina (ob-R)

Através da técnica de imunohistoquímica, avaliou-se a expressão de recetores de leptina (Ob-R) ao nível das glândulas salivares maiores (submandibular, parótida e sublingual). Esta marcação, indica-nos que, aparentemente, existe uma maior expressão deste recetor no grupo que esteve sujeito à hormona leptina, quando comparado com os animais dos grupos soro e controlo. Em todas as amostras o recetor funcional de leptina está mais expresso ao nível da glândula submandibular, nomeadamente a nível dos ductos granulares. A sua expressão é principalmente a nível da membrana apical das células, existindo também alguma marcação citoplasmática. Nas glândulas sublinguais observou-se também marcação, ainda que esta tenha sido mais ténue, bem como no citoplasma das células dos ductos. Em relação aos ácinos a expressão é quase inexistente. Na glândula parótida não se verifica qualquer expressão (Tabela 3 e Figura 15).

Tabela 3. Intensidade de coloração para o recetor de leptina nas diferentes estruturas das glândulas salivares maiores¹

Glândula	Estruturas	Controlo	Soro	Leptina
Parótida	Ácinos	-	-	-
	Ductos estriados	-	-	-
Submandibular	Ácinos	-	-	±
	Ductos granulares	+	+	++
Glândulas menores da Língua	Ácinos	-	-	-
	Ductos	+	+	+

¹ - (negativo); ± (imunomarcação focal); + (imunomarcação fraca); ++ (imunomarcação moderada); +++ (imunomarcação forte).

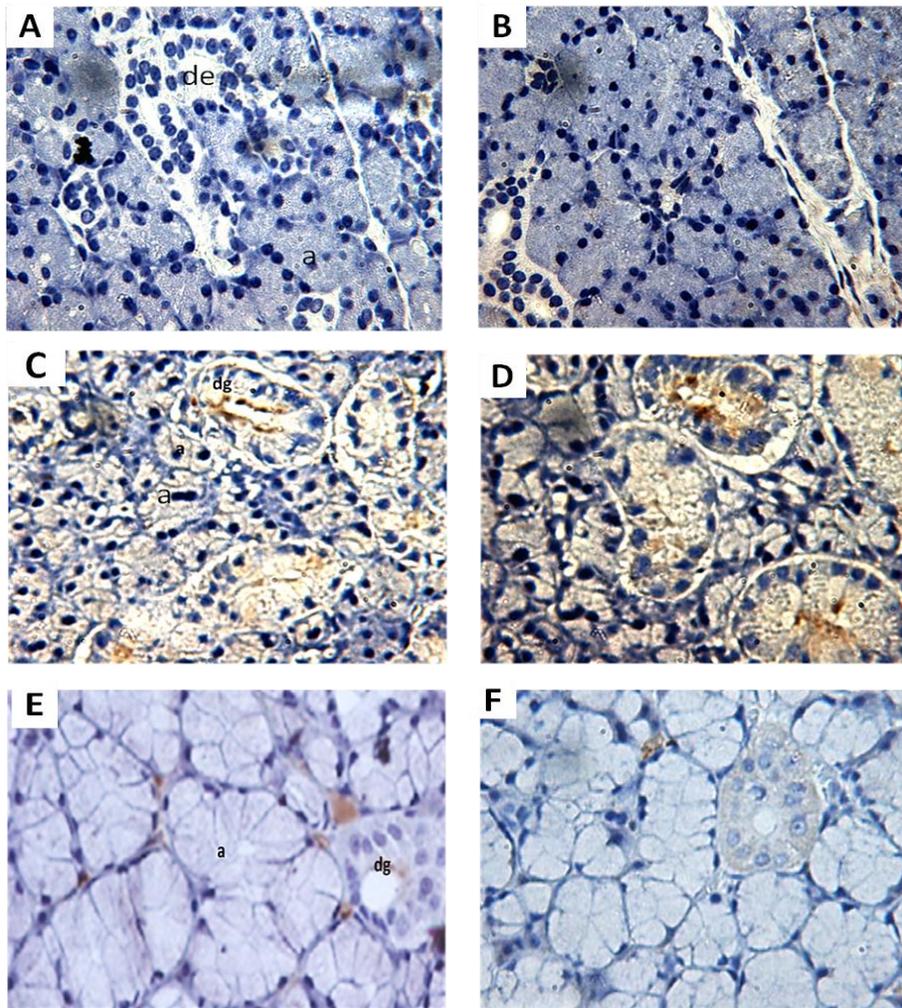


Figura 15. Imunomarcacão para o recetor Ob-R, evidenciada pela cor castanha nas glândulas salivares maiores. A (parótida soro); B (parótida leptina); C (submandibular soro); D (submandibular leptina); E (sublingual soro); F (sublingual leptina). a- ácino; dg- ducto granular; de- ducto estriado. Ampliação de 250X.

6.2. Expressão e atividade enzimática da alfa-amilase em frações subcelulares das glândulas salivares maiores

6.2.1. Determinação da concentração proteica pelo método de Bradford

Após separação das frações subcelulares (citosólica, mitocondrial e membranar) de cada uma das glândulas (parótidas e submandibulares/sublinguais), a determinação da concentração em proteína total foi feita pelo método de Bradford.

A partir da leitura dos valores de absorvência, de soluções padrões de concentrações conhecidas, obteve-se a curva padrão ou curva de calibração. Com esta curva, pode-se determinar a concentração em proteína total de cada uma das amostras, através da interpolação dos valores na equação da reta obtida. A determinação foi feita em placas de 96 poços, tendo-se obtido uma curva por placa. Na figura seguinte (Figura 16) apresenta-se, como exemplo, uma das curvas obtidas.

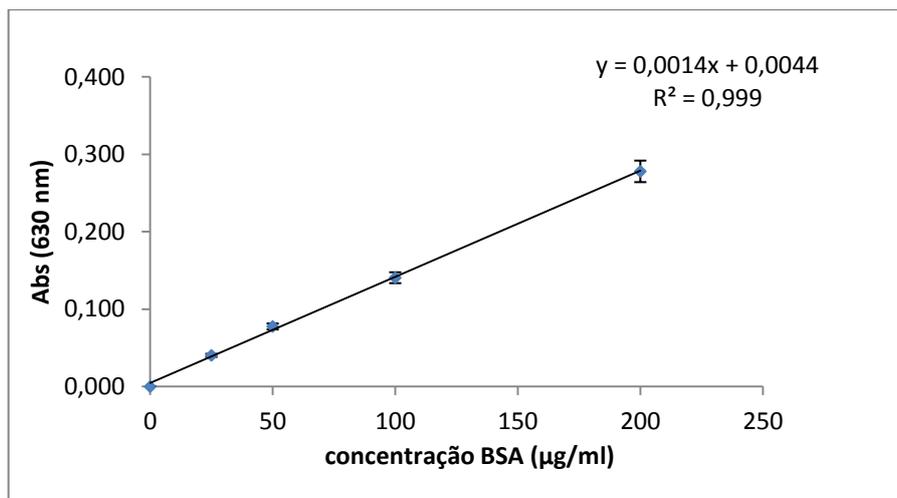


Figura 16. Exemplo de curva padrão de BSA

Os valores obtidos para cada uma das amostras, estão apresentados em anexo. (Anexo 2, Tabela I e Tabela II).

As concentrações proteicas destas frações foram determinadas por serem necessárias para os estudos posteriores (determinação da atividade enzimática da alfa-amilase e imunomarcacão por Western-Blotting).

6.2.2. Determinação da atividade enzimática de alfa-amilase

Na determinação da atividade enzimática, vários fatores como temperatura, pH do enzima alfa-amilase, são tidos em conta.

A determinação da atividade enzimática da proteína alfa-amilase foi feita nas frações citosólica e mitocondrial, das glândulas parótidas e submandibulares/sublinguais, por serem as frações onde existe esta proteína. A fração mitocondrial foi uma das analisadas, dado que estudos prévios (Vitorino *et al.*, *não publicado*) observaram que parte das vesículas onde as proteínas se encontram armazenadas apresenta densidade semelhante à das mitocôndrias, sendo retidas nesta fração.

Para determinação da quantidade de açúcares redutores, produzida em resultado da ação enzimática da amilase no amido, foi traçada uma curva padrão de glucose (Figura 17).

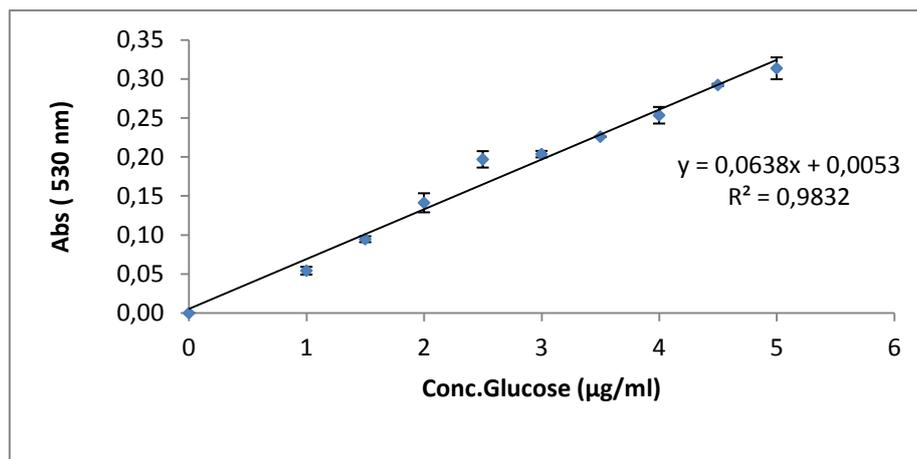


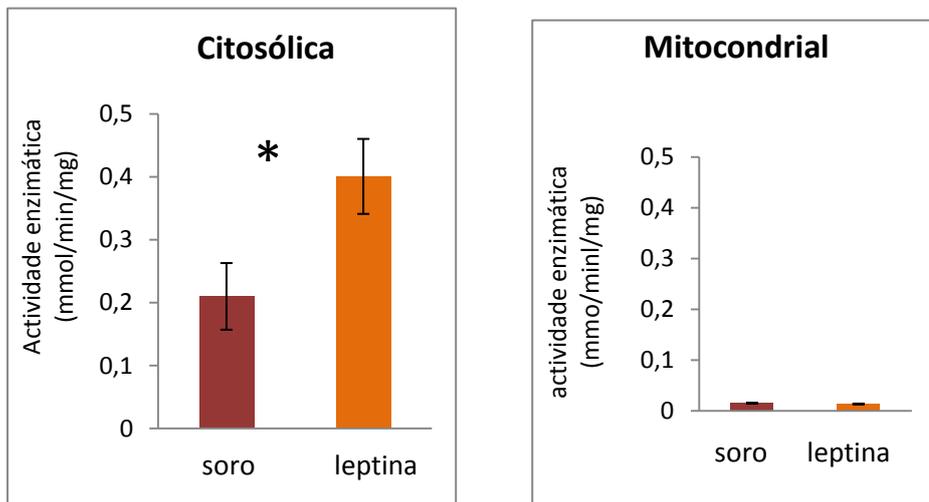
Figura 17. Exemplo de curva de glucose usada na determinação da atividade enzimática

Para determinar qual a melhor quantidade de proteína a aplicar, uma amostra de um animal do grupo controlo (animais “testemunha”) foi testada para diferentes quantidades de proteína (Anexo 3, Tabela III, Tabela IV e Tabela V).

A partir destes resultados obtidos a uma absorvência de 530 nm, escolhemos uma concentração/quantidade de proteína a aplicar, para a qual os valores de absorvência obtidos caiam numa zona mais linear da curva. Tentou-se evitar os valores entre 0 e 1,5 pois constatou-se que a curva de glucose é menos linear, sendo mais linear a partir daí.

Com base nestes resultados foram utilizadas para a determinação da atividade enzimática quantidades de proteína (em μg) de 0,25; 0,5 e 1 para a fração citosólica da parótida, quantidades de 4, 6 e 8 para a fração citosólica da submandibular e quantidades de 15, 20 e 25 para a fração mitocondrial da parótida e submandibular.

Em termos de resultados obtidos em ambas as frações analisadas, verificou-se que a fração citosólica é a que apresenta maior atividade enzimática específica (U/mg). Para o grupo do soro o valor apresentado foi de $0,21 \pm 0,11$ mmol/min/mg, enquanto para o grupo da leptina o valor foi de $0,39 \pm 0,15$ mmol/min/mg, quase o dobro da atividade expressa que nos animais do primeiro grupo ($P=0,041$) (Figura 18). Já na fração mitocondrial, o grupo do soro apresentou atividade de $0,015 \pm 0,0036$ mmol/min/mg enquanto o grupo leptina da $0,013 \pm 0,0076$ mmol/min/mg, valores estes que não apresentam diferenças estatisticamente significativas ($P=0,649$).



*apresentam diferenças significativas, $P < 0,05$

Figura 18. Atividade enzimática da alfa amilase em ambas as frações (citosólica e mitocondrial) da glândula parótida.

Quanto à atividade enzimática da alfa-amilase nas glândulas submandibulares/sublinguais, em ambas as frações analisadas (citosólica e mitocondrial), observaram-se valores baixos quando comparados com os valores observados na parótida. Não se observaram diferenças entre os grupos, sendo que na fração citosólica, os valores foram de $0,0062 \pm 0,0045$ mmol/min/mg e de $0,0054 \pm 0,0034$ mmol/min/mg para soro e leptina respetivamente ($P=0,777$), enquanto na fração mitocondrial os valores obtidos foram de $0,0017 \pm 0,0006$

mmol/min/mg para o soro e de $0,0008 \pm 0,0005$ mmol/min/mg para o grupo da leptina ($P=0,128$) (Figura 19).

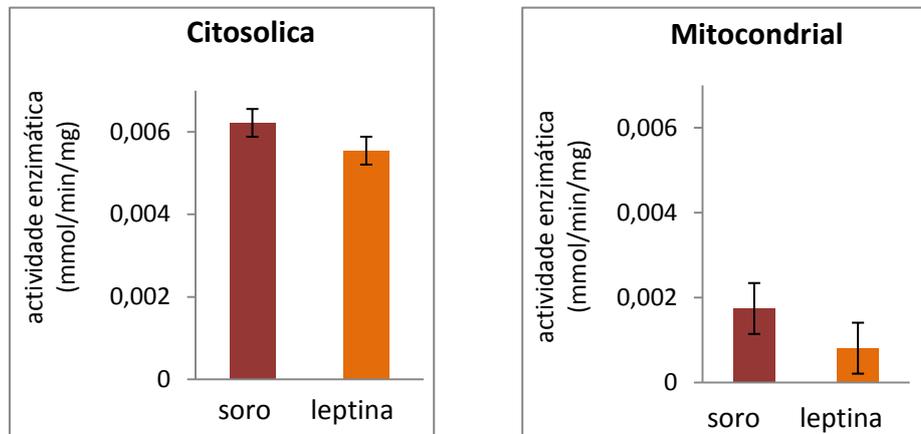
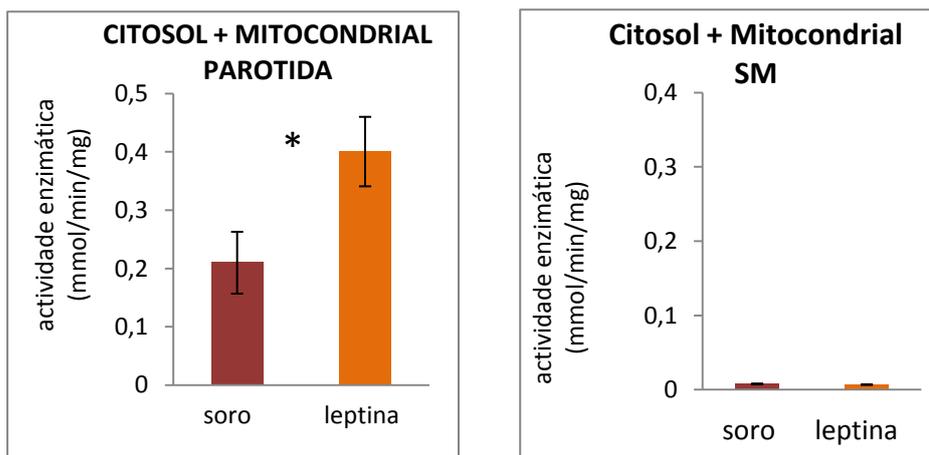


Figura 19. Atividade enzimática da alfa amilase em ambas as frações (citossólica e mitocondrial) na glândula submandibular/sublingual

No que diz respeito á atividade enzimática específica total (ou seja, considerando conjuntamente as atividades observadas para as frações citossólica e mitocondrial), observaram-se valores significativamente mais elevados para o grupo de animais tratados com leptina ($P=0,044$) (Figura 20). Estas diferenças só se observam ao nível das glândulas salivares parótidas, pois ao nível da submandibular apresentam ($P=0,657$).



*apresentam diferenças significativas, $P<0,05$

Figura 20. Somatório da contribuição de ambas as frações (citossólica e mitocondrial) em cada uma das glândulas estudadas, parótida e submandibular.

6.2.3. Avaliação da expressão de alfa-amilase salivar por Western blotting

Foi feita imunomarcção, através da técnica de Western-blot para identificar a presença e comparar a intensidade de expressão da proteína alfa-amilase, nas frações citoplasmática e mitocondrial das glândulas parótidas. Tendo em conta a baixa atividade enzimática observada para as frações sub-celulares das glândulas submandibulares/sublinguais, a imunomarcção não foi feita para estas.

De modo a aferir acerca da quantidade de proteína a aplicar por amostra, de modo a ter marcação em condições de análise, foram testadas diferentes quantidades de proteína para uma mesma amostra (de um rato controlo – “testemunha”), quer para a fração mitocondrial, quer para a fração citoplasmática. Tendo em conta os resultados obtidos (Figuras 21 e 22), para comparação das diferentes amostras foram aplicadas quantidades de 6 μg para a fração citosólica e de 40 μg de proteína total, para a fração mitocondrial.

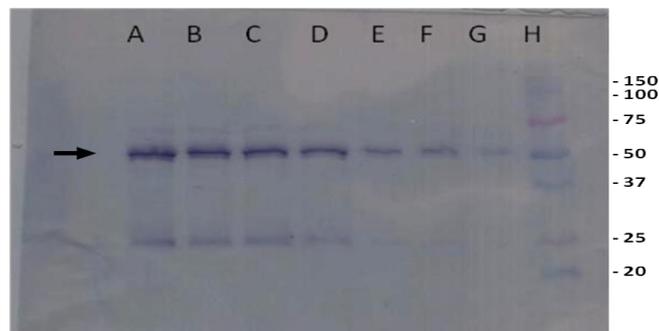


Figura 21. Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração citosólica (A- 10 μg , B- 6 μg , C- 5 μg , D- 4 μg , E- 3 μg , F- 2 μg , G- 1 μg , H-MW) Peso molecular em kDa (bandas 20, 25, 37, 50, 75, 100 e 150)

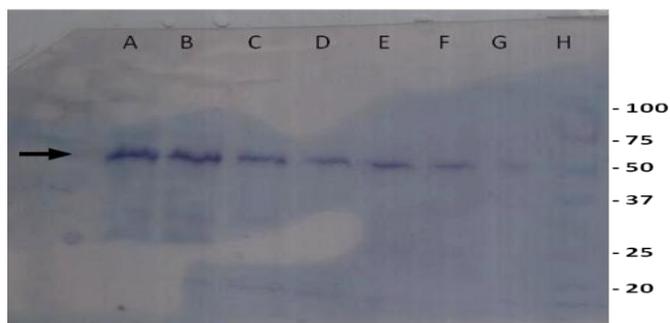


Figura 22. Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração mitocondrial (A- 50 μg , B- 40 μg , C- 30 μg , D- 20 μg , E- 15 μg , F- 10 μg , G- 6 μg , H-MW, I- 3 μg). Peso molecular em kDa (bandas 20, 25, 37, 50, 75 e 100)

Para as diferentes amostras em estudo, as bandas marcadas foram analisadas, em termos de volume através do software gel analyser. As mesmas membranas marcadas primeiramente com alfa-amilase foram, posteriormente marcadas com beta-actina, de modo a poder normalizar os valores para a quantidade de proteína e assim poder comparar amostras diferentes (Anexo 4).

Não se observaram diferenças significativas entre os grupos soro e leptina, nem na fração citosólica nem na fração mitocondrial (Figura 23 e 24).

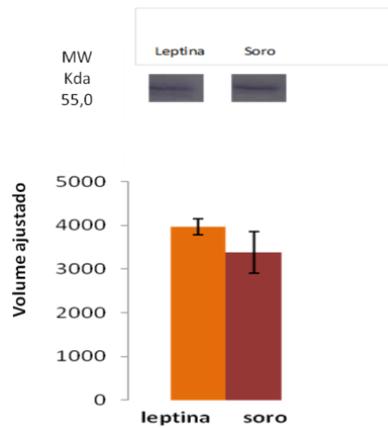


Figura 23. Expressão de amilase na fração citosólica das glândulas parótidas

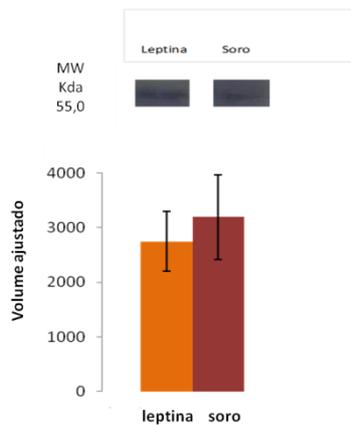


Figura 24. Expressão de amilase na fração mitocondrial das glândulas parótidas

6.2.4. Avaliação da expressão de receptores de leptina na fração membrana por Western blotting

De modo a aferir acerca da quantidade de proteína a aplicar por amostra, de modo a ter marcação em condições de análise, foram testadas diferentes quantidades de proteína para uma mesma amostra (de um rato controlo – “testemunha”), como descrito anteriormente para a análise da expressão de alfa-amilase. Tendo em conta os resultados obtidos (Figuras 25 e 26), para comparação das diferentes amostras foram aplicadas quantidades de 90 µg de proteína total, para a glândula submandibular e de 33 µg para a parótida.

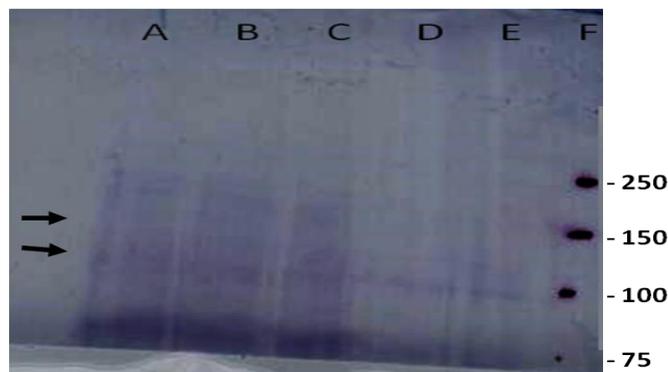


Figura 25. Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração membrana da glândula submandibular/sublingual (A- 115, B- 100, C- 75, D- 25, E- 50, F- MW) (setas representam local de marcação da banda de receptores e beta-actina). Peso molecular em kDa (bandas de 75, 100, 150 e 200).

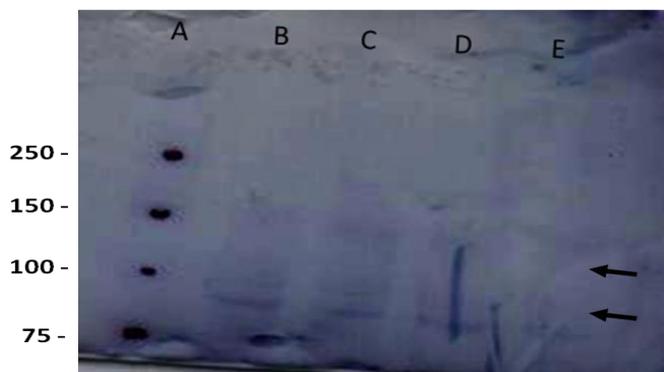


Figura 26. Quantidades de proteínas testadas para aferição da quantidade a aplicar para a fração membrana da glândula parótida (A- MW, B- 25, C- 20, D- 15, E- 10) (setas representam local de marcação da banda de receptores e beta-actina). Peso molecular em kDa (bandas de 75, 100, 150 e 200).

Para as diferentes amostras em estudo, as bandas marcadas foram analisadas, em termos de volume através do software gel analyser. As mesmas membranas marcadas com recetor leptina foram também marcadas com beta-actina, de modo a poder-se normalizar os valores para a quantidade de proteína e assim poder comparar as diferentes amostras (Anexo 4).

Não se observaram diferenças significativas entre os animais do grupos do soro e os animais do grupo da leptina, (Figuras 27 e 28).

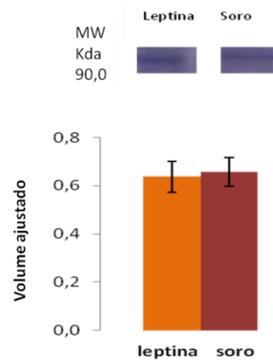


Figura 27. Expressão de recetores de leptina na na fração membranas das glândulas parótida

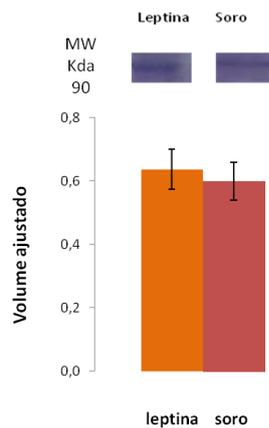


Figura 28. Expressão de recetores de leptina na fração membranas das glândulas submandibular/sublingual.

Discussão dos resultados

Os animais utilizados no presente trabalho tinham sido monitorizados, diariamente, relativamente aos pesos vivos e ao consumo de ração, quer na fase anterior à administração de leptina, quer ao longo do período de ensaio. Os animais não apresentaram pesos diferentes em ponto nenhum do ensaio. Já no que diz respeito ao consumo de alimento, este diminuiu, em termos médios, nos animais do grupo que recebeu leptina, durante os primeiros 3 dias de ensaio, tendo deixado de ser diferentes a partir daí (Neves, 2014).

Estas alterações no consumo de alimento, por parte dos animais que receberam leptina, que ocorreu nos primeiros dias do ensaio, demonstram que a hormona administrada teve efeito de saciedade.

No presente trabalho foi observado que os animais submetidos a hiperleptinémia apresentaram menores ácinos serosos das parótidas e glândulas menores linguais, tal como ácinos seromucosos das glândulas submandibulares menores, comparativamente aos animais que receberam soro.

(Higa *et al.*, 2002), avaliaram o papel da leptina nas glândulas salivares de rato, através da infusão de um adenovírus recombinante contendo o cDNA para a leptina de rato (AdCMV-leptina), tendo observado que os pesos das glândulas salivares maiores, desses ratos, era cerca de 52% mais baixos que os de ratos controlo com alimentação restringida aos níveis consumidos pelos animais hiperleptinémicos. Estes autores, ainda que não tenham elucidado os mecanismos potencialmente responsáveis por este fenómeno, referiram a possibilidade da leptina circulante ter ação indireta.

Sendo a leptina uma hormona conhecida por induzir saciedade, poder-se-ia pensar que uma menor dimensão dos ácinos das glândulas salivares se pudesse dever a alterações na quantidade de alimento consumido. De facto, há estudos que referem alterações no tamanho das glândulas salivares em função da taxa de mastigação. Por exemplo, estudos realizados por Dawes (1970) demonstraram que o tamanho e a atividade das glândulas salivares são influenciados pelo consumo de dietas que requerem muita mastigação ou cuja estimulação gustativa seja agradável. Estes autores observaram ainda que ratos sujeitos a uma redução na ingestão de alimento sólido, apresentam atrofia das glândulas salivares. Há também estudos que referem que dietas líquidas também conduzem a uma atrofia das glândulas salivares (Dawes, 1970). No entanto, no presente trabalho os consumos

de alimento não diferiram a partir do 3º dia, o que torna pouco provável a hipótese de menor taxa de mastigação por parte do grupo que recebeu leptina. Assim, é mais provável que os resultados obtidos se devam à própria ação da leptina.

Colocando a hipótese do efeito desta hormona ser indirecto, podia pensar-se numa ação mediada pelo sistema nervoso simpático. É sabido que a leptina resulta em ativação deste ramo do sistema nervoso autónomo (Eikelis *et al.*, 2014). Se existisse uma ativação do sistema nervoso simpático, poder-se-ia esperar um aumento das dimensões dos ácinos serosos, em vez de uma diminuição, uma vez que estudos utilizando agentes simpatomiméticos (ex isoproterenol) referem a hipertrofia das células acinares (Andrade *et al.*, 2004). Assim, é possível que o efeito da leptina seja directo. A leptina, tal como a maioria das hormonas, atua mediante a sua ligação a recetores específicos, Ob-R (Shánchez *et al.*, 2005). Para glândulas salivares de humanos (De Matteis *et al.*, 2002) e de algumas espécies animais, como o cavalo (Dall'Aglio *et al.*, 2012) a presença de recetores de leptina foi já observada. No caso dos roedores, apesar de não terem sido encontradas referências na bibliografia, tanto em estudos prévios da nossa equipa (Rodrigues, 2012), como no presente trabalho, foi observado que os recetores de leptina são expressos nas glândulas salivares, com maior expressão nas glândulas submandibulares. Assim, podemos considerar a possibilidade da leptina exercer efeitos directos a nível destes recetores, se bem que são necessários estudos futuros para elucidar esta questão.

No presente trabalho, a função secretora das glândulas foi ainda estudada através da avaliação da expressão e atividade enzimática de amilase, uma vez que esta é a proteína salivar presente em maior proporção na saliva, estando os seus níveis dependentes do tipo de estimulação (An *et al.*, 2011). Em relação à atividade enzimática do enzima alfa amilase, é a fração citoplasmática da glândula parótida que apresenta a maior parte da contribuição desta atividade, sendo o valor significativamente mais elevado nos animais do grupo da leptina. No que diz respeito à expressão desta proteína, avaliada por imunomarcação por western blot e por imuno-histoquímica, não se observaram diferenças. Estes resultados de maior atividade enzimática, observada nas glândulas de indivíduos hiperleptinémicos, parecem ir na direção oposta dos resultados obtidos na saliva dos mesmos animais. Na saliva dos ratos hiperleptinémicos do presente estudo, foram observados valores mais baixos de atividade enzimática (Ribeiro, 2014) e de expressão proteica (Neves, 2014) de amilase. Uma das hipóteses, que deverá ser explorada em estudos futuros, é que a leptina provoque alterações em termos de secreção salivar, não

levando a alterações na síntese de amilase, levando a que os animais hiperleptinémicos apresentassem uma menor atividade desta enzima.

Ainda que as diferenças entre grupos, a nível da expressão de recetores de leptina, só tenha sido evidenciada através da técnica de imuno-histoquímica, estas alterações não são de excluir. No presente trabalho, parece haver um aumento de expressão destes recetores por parte dos animais que se tornaram hiperleptinémicos. Uma hipótese é que esta diferente expressão de recetores esteja associada às diferenças entre os grupos, a nível dos diversos parâmetros descritos anteriormente. É ainda de realçar que o facto das diferenças de expressão de recetores, observadas através da técnica de imunohistoquímica, não terem sido observadas por Western blot, se pode dever a uma necessidade de otimização deste último para as amostras e anticorpo em questão. De facto, a marcação conseguida foi muito pouco intensa, dificultando a comparação entre grupos. Assim, é necessário aumentar a quantidade de proteína total, ou modificar outros parâmetros, de modo a conseguir uma marcação mais intensa. A possibilidade de alterações na expressão de recetores de leptina, nas glândulas salivares, induzida por alterações nos níveis de leptina circulante, não foram referidos. No entanto, há estudos que sugerem que a quantidade de leptina circulante influencia a quantidade de recetores de leptina, noutros órgãos, ainda que este seja um assunto controverso (Mitchell *et al.*, 2009).

VI. Conclusões

O trabalho realizado permitiu concluir:

- Em relação à histo-morfometria das glândulas salivares são os ácinos serosos aqueles onde se observam reduções estatisticamente significativas, para os animais hiperleptinemicos.
- As glândulas salivares maiores e menores da língua são afetadas por níveis de leptina circulante elevados.
- A leptina induz alterações nos níveis de amilase, a nível das glândulas salivares, sendo que essas alterações se observam em termos de atividade enzimática desta proteína.
- Níveis circulantes de leptina elevados parecem induzir aumentos na expressão de recetores para esta hormona, a nível dos ductos granulares das glândulas submandibulares.

VII. Bibliografia

- ✓ An H, Shin P, Do Kyung L, Jung K, Min C, Si Won L, Hyung L, Kyung K, Nam H. Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. In high fat diet-induced obese rats. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10:116.
- ✓ Appelhans B. Circulating leptin moderates the effect of stress on snack intake independent of body mass. *Eating Behaviors*. 2010; 11: 152–155.
- ✓ Aras H. Secretory and Anti-inflammatory actions of some gastro-intestinal hormones in salivary glands. University of Gothenburg. 2009.
- ✓ Areias C. Efeito da composição da saliva na prevalência da cárie dentária em crianças com trissomia 21. Faculdade de Medicina Dentária. 2011.
- ✓ Banks A, Davis S, Bates S, Myers M. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 2000; 275: 14563-145672.
- ✓ Campfield L, Smith F. Overview: Neurobiology of OB protein Leptin. *Proc Nutr Soc*. 1998; 57: 429-40.
- ✓ Chapelot D, Marmonier C, Thomas F, Hanontin C. Modalities of the food intake-reducing effect of sibutramine in humans. *Physiology & Behavior*. 2009; 68: 299–308.
- ✓ Caseiro A, Ferreira R, Padrão A, Quintaneiro C, Pereira A, Marinheiro R, Vitorino R, Amado F. Salivary proteome and peptidome profiling in type 1 diabetes mellitus using a quantitative approach. *J Proteome Res*. 2013; 12: 1700-1709.
- ✓ Catalán M, Nakamoto T, Melvin E. The salivary gland secretion mechanism. *The Journal of Medical Investigation*. 2009; 56: 192-1966.
- ✓ Ceddia R, William W, Curi R. Leptin Increases Glucose Transport and Utilization in Skeletal Muscle in Vitro. *Gen. Pharmac*. 1998; 31: 799– 801.
- ✓ Cook J, Schaefer L, Lepage P, Morgan S. Salivary vs. serum Cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Canadian Journal of Animal Science*. 1996; 76: 329-335.
- ✓ Danz M, Lupp A, Linss W. The granulated convoluted tubules of the rat submandibular glands under experimental conditions. *Annals of anatomy*. 1999; 181: 133-137.
- ✓ Dardeno T, Chou S, Moon H, Chamerland J. Leptin in human physiology and therapeutics. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2010; 31: 377-393.
- ✓ 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*. 1993.
- ✓ Dall'Aglio C, Maranesi M, Pascucci L, Mercati F, Ceccarelli P. Immunohistochemical distribution of leptin receptor in the major salivary glands of horses. *Res. Vet. Sci.* 2012; 93: 1116-1118.
- ✓ 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.
- ✓ Ellis L, Auclair L, Gnepp R. *Surgical Pathology of the Salivary Glands*. Philadelphia: W.B Saunders Company. 1991.
- ✓ Eliasson L, Carlen A, Laine M, Birkhed D. Minor gland and whole saliva in postmenopausal women using a low potency oestrogen (oestril). *Arch Oral Biol*. 2003; 48: 511-7.
- ✓ 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: 31-45.
- ✓ Fischer-Posovszky P, Wabitsch M, Hochberg Z. Endocrinology of adipose tissue – an update. *Horm Metab Res*. 2007; 39: 314-321.
- ✓ Friedman M, Halaas J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998; 395: 763-770.
- ✓ Fruhbeck G, Catalán V, Ambrosi J, Rodriguez A. Aquaporin-7 and glycerol permeability as novel obesity drug-target pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006; 27: 344-347
- ✓ 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.
- ✓ Gröschl M, Rauh M, Wagner R, Neuhuber W, Metzler M, Tamgüney G, Zenk J, Schoof E, Dörr G, Blum F, Rascher W, Dötsch J. Identification of leptin in human saliva. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 5234-5239
- ✓ Haynes G, Correia M, Mark A. A leptin-sympathetic-leptin feedback loop: potential implications for regulation of arterial pressure and body fat. *Scandinavian Physiological Society*. 2003; 177: 345-349.
- ✓ Harris M, Edgar M, Meghji S. Saliva: its secretion, composition and functions. *Clinical Oral Science*. 1998; 179-189.

- ✓ Harthoorn Lucien F. Salivary alfa-amylase: A measure associated with satiety and subsequent food intake in humans. *International Dairy Journal*. 2008; 18: 879-883.
- ✓ Harthoorn L, Schipper R, Loof A, Vereijken P, Heerde W, Dransfield E. Salivary biomarkers associated with perceived satiety and body mass in humans. *Proteomics Clin. Appl.* 2007; 1: 1637–1650
- ✓ Hu S, Xie Y, Ramachandran P, Ogorzalek Loo R, Li Y, Loo J, Wong T. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis/mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5: 1714-1728.
- ✓ Huang Q, Arvaniti K, Richard D. Effects of leptin and corticosterone on the expression of corticotropin-releasing hormone, agouti-related protein, and proopiomelanocortin in the brain of ob/ob mouse. *Neuroendocrinology*. 2001; 73: 227-36.
- ✓ Huo L, Gamber K, Greeley S, Silva J, Huntoon N, Leng H, Bjorbaed C. Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. *Cell Metabolism*, 2009; 9: 537-547.
- ✓ Humphrey S, Williamson R. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2001; 85: 162-169.
- ✓ Jenkins N. *The physiology and biochemistry of the mouth*. Blackwell, Oxford, 1978.
- ✓ 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.
- ✓ Kielar D, Clechanowicz A, Kurzawski, Naruszawicz. Leptin Receptor Isoforms Expressed in Human Adipose Tissue. *Metabolism*. 1998; 47: 844-847.
- ✓ Kurabuchi S, Matsuoka T, Hosoi K. Hormone-induced granular convoluted tubule cells in mouse parotid gland. *The Journal of Medical Investigation*. 2009; 56: 290-295.
- ✓ Lamont R, Lantz M, Burne R, LeBlanc D. *Oral microbiology and immunology*. ASM press. 2006; 47-71, 89-105, 231-252, 333-335.
- ✓ Leone A, Spatola G, Cucco D, Tessitore V, Bonaventura G, Uzzo ML. Immunohistochemical expression and distribution of orexin, orphanin and leptin in the major salivary glands of some mammals. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2012.
- ✓ Lingström P, Moynihan P. Nutrition, saliva, and oral health. *Nutrition*. 2003; 19: 567–569.

- ✓ Mahay S, Adeghate E, Lindley M, Rolph C, Singh J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus alters the morphology, secretory function and acyl lipid contents in the isolated rat parotid salivary gland. *Mol Cell Biochem.* 2004; 261: 175-181.
- ✓ Matteis G, Saccata M, Francesco M, Petrera F, Abeni F, Catillo G, Napolitano F, Muioli B. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the *leptin* and *leptin receptor* genes on milk and morphological traits in Holstein cows. *European Journal of Medical Research.* 2012; 15: 50-54.
- ✓ Matsuo R. Central connections for salivary innervations and efferent impulse formation In Neural mechanisms of salivary gland secretion. *Front Oral Biol, Karger,* 2000; 11: 26-43.
- ✓ Meurman JH, Tarkkila L, Tiitinen A. The menopause and oral health. *Maturitas.* 2009; 63: 56–62.
- ✓ Moore P, Guggenheimer J, Etzel K, Weyant R, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1992; 92: 281-91.
- ✓ Murdoch-Kinch A, Russo N, Griffith S, Braun T, Eisbruch A, Silva J. Recovery of salivary epidermal growth factor in parotid saliva following parotid sparing radiation therapy: a proof-of-principle study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 97: 28-46.
- ✓ Negrão A, Licinio J. A Neuroendocrinologia da Leptina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000; 44: 205-214.
- ✓ Neves S. Efeitos da Hiperleptinemia na Secreção de Proteínas Salivares. 2014; *Tese de dissertação de mestrado em Bioquímica pela Universidade de Évora.*
- ✓ Paracchini V, Pedotti P, Taioli E. Genetics of Leptin and Obesity: A Huge Review. *American Journal of epidemiology.* 2005; 162: 101-114.
- ✓ Pederson J, Karlstrom K, Sharp W, McIntosh W. Differential incision of Grand Canyon related to Quaternary faulting. U-series and Ar/Ar dating: *Geology.* 2002; 30: 739–742.
- ✓ Pederson M, Bardow A, Jensen B, Nauntofte B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis.* 2009; 8:117–29.
- ✓ Picco D, Delbem A, Costa L, Antoniali C. Efeito da hipertensão na atividade salivar, na capacidade tamponante e nas concentrações de fluoreto e cálcio da saliva. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2008; 37.
- ✓ Ribeiro S. Efeito da hiperleptinemia na histologia das glândulas salivares e na atividade enzimática da alfa-amilase salivar. 2014; Relatório de estágio do 1º ciclo em bioquímica, Universidade de Évora.

- ✓ Rodrigues L. *Avaliação de alterações no perfil proteico da saliva de modelo animal de obesidade. 2012; Tese de dissertação do Mestrado em Ciências Biomédicas, Universidade do Algarve, Faro, Portugal.*
- ✓ Sandoval D, Davis N, Leptin: metabolic control and regulation. *J Diab Compl.* 2003; 17: 108-13.
- ✓ Simón E, Del Barrio, A. Leptina y Obesidad., *Anales Sis San Navarra.* 2002; 25: 53-64.
- ✓ Smith J, Wang J, Lin Y, Tinchalk C. Pharmacokinetics of the Chlorpyrifos Metabolite 3,5,6-Trichloro-2-Pyridinol (TCPy) in Rat Saliva. *Toxicological sciences.* 2009; 113: 315–325.
- ✓ Soo-Quee D, Choon-Huat G. The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine. *Occup Environ Med.* 2007; 64: 202-210.
- ✓ Taga, R. Estudo estereológico dos diferentes componentes estruturais de glândulas submandibulares de ratos machos e fêmeas. *Rev. FOB, v.5, 1997 51-57*
- ✓ Urena J. *Microbiologia oral.* McGraw Hill Interamericana. 1997; 219-255, 361-369.
- ✓ Wank A. Identification of the amino acids responsible for cholecystokinin receptor subtype selectivity for gastrin. *Official Journal of the Aga Institute.* 1995; 108: 198-209.

VIII. Anexos

Anexo I

Análise estatística dos resultados - histologia

Ácinos serosos língua

Distribuição:

Tests of Normality							
	grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
área	control	,078	208	,004	,970	208	,000
	o leptina	,107	219	,000	,890	219	,000
	soro	,069	234	,009	,958	234	,000
perímetro	control	,049	208	,200*	,993	208	,421
	o leptina	,057	219	,085	,967	219	,000
	soro	,043	234	,200*	,992	234	,196

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

No caso da área, a distribuição não é normal para nenhum dos grupos, enquanto no caso do perímetro é para os grupos controlo e soro. No entanto, como para um dos grupos a distribuição não é normal (pelo teste de Shapiro-Wilk há diferença significativa), vamos usar testes não paramétricos para os dois parâmetros.

Assim, foi feita uma análise não paramétrica Kruskal-Wallis

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of area is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of perimetro is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

De acordo com esta, há diferenças significativas entre os grupos. No entanto, com este output não sabemos entre que grupos é que essas diferenças existem.

Assim foi elaborada uma escala de ranks, de modo a "normalizar" ou "estandardizar" os dados para com estes valores se fazer uma análise de variância GLM (multivariada). Aqui a comparação post-hoc foi feita utilizando o teste LSD. O output foi:

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Rank of área	controle	leptina	144,97167*	17,181700	,000	111,23410	178,70924
		soro	-11,05529	16,911319	,514	-44,26194	22,15137
	leptina	controle	-	17,181700	,000	-	-
		soro	144,97167*	16,684955	,000	178,70924	111,23410
	soro	soro	-	16,684955	,000	-	-
		leptina	156,02696*	16,684955	,000	188,78913	123,26478
Rank of perímetro	controle	leptina	11,05529	16,911319	,514	-22,15137	44,26194
		soro	156,02696*	16,684955	,000	123,26478	188,78913
	leptina	leptina	147,36839*	17,151677	,000	113,68977	181,04701
		soro	-9,73344	16,881768	,564	-42,88207	23,41519
	soro	leptina	-	17,151677	,000	-	-
		soro	147,36839*	16,655800	,000	181,04701	113,68977
soro	leptina	-	16,655800	,000	-	-	
	leptina	157,10183*	16,655800	,000	189,80676	124,39691	
soro	leptina	9,73344	16,881768	,564	-23,41519	42,88207	
	leptina	157,10183*	16,655800	,000	124,39691	189,80676	

Alterações nas glândulas salivares provocadas por hiperleptinémia em modelo animal

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 31382,878.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

Com base neste output, as diferenças em termos de área são entre os grupos controlo e leptina (P=0,000) e entre os grupos soro e leptina (P=0,000). Os grupos controlo e soro não diferem entre si (P=0,514). O mesmo acontece relativamente aos perímetros.

Estatística descritiva

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum		
					Lower Bound	Upper Bound				
área	controlo	20	71416,65	22715,59	1575,043	68311,47	74521,83	28728	154906	
	soro	23	72863,37	22459,02	1468,192	69970,74	75756,00	30676	180524	
	leptina	21	55797,06	21086,97	1424,925	52988,67	58605,45	19669	143900	
	Total	66	66753,78	23381,62	909,440	64968,03	68539,52	19669	180524	
		1			9					
perímetro	controlo	20	1085,014	169,8270	11,77538	1061,799	1108,229	686,50	1596,93	
	soro	23	1094,254	161,4370	10,55346	1073,461	1115,046	738,20	1628,44	
	leptina	21	952,8211	170,8032	11,54181	930,0733	975,5690	592,13	1566,20	
	Total	66	1044,487	179,0708	6,965050	1030,811	1058,163	592,13	1628,44	
		1		67	90	39	34	99	20	49

Ácinos mucosos língua

Distribuição:

Tests of Normality							
	grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
área	control	,068	230	,011	,971	230	,000
	o leptina	,076	268	,001	,956	268	,000
	soro	,103	262	,000	,964	262	,000
perímetro	control	,042	230	,200*	,988	230	,048
	o leptina	,054	268	,060	,981	268	,001
	soro	,090	262	,000	,978	262	,000

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

A distribuição não é normal em nenhum dos grupos, nem para a área nem para o perímetro.

Assim, foi feita uma análise não paramétrica Kruskal-Wallis

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of area is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of perímetro is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

De acordo com este existem diferenças entre os grupos, quer nas áreas, quer nos perímetros dos ácinos mucosos.

Para saber entre que grupos é observada a diferença, foi feita uma análise GLM multivariada, aos dados standardizados (após análise de ranks).

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Rank of area	controle	leptina	229,31944*	17,865131	,000	194,24835	264,39052	
		soro	154,63575*	17,959360	,000	119,37968	189,89181	
	leptina	controle	-	17,865131	,000	-	-	
		soro	229,31944*	17,268028	,000	264,39052	194,24835	
	Rank of perimetro	soro	leptina	-74,68369*	17,268028	,000	-	-40,78478
			controle	108,58260	17,959360	,000	108,58260	-
controle		leptina	-	17,959360	,000	-	-	
		soro	154,63575*	17,831566	,000	189,89181	119,37968	
Rank of perimetro	leptina	leptina	74,68369*	17,268028	,000	40,78478	108,58260	
		soro	231,49103*	17,831566	,000	196,48583	266,49622	
	soro	leptina	154,70350*	17,925617	,000	119,51367	189,89333	
		controle	-	17,831566	,000	-	-	
	leptina	controle	231,49103*	17,831566	,000	266,49622	196,48583	
		soro	-76,78753*	17,235585	,000	-	-42,95230	
soro	controle	110,62275	17,925617	,000	110,62275	-		
	leptina	-	17,925617	,000	-	-		
			154,70350*	17,925617	,000	189,89333	119,51367	
			76,78753*	17,235585	,000	42,95230	110,62275	

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 39356,119.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

De acordo com esta análise, a diferença observa-se entre todos os grupos, para área e perímetro.

Estatística descritiva

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
área	control	23	58862,19	15415,463	1016,466	56859,37	60865,01	29938	111421
	soro	26	47047,50	13322,854	823,089	45426,76	48668,24	20021	94422
	leptina	26	41838,22	16104,803	983,757	39901,32	43775,13	13483	98443
	Total	76	48786,04	16517,514	599,153	47609,85	49962,24	13483	111421
perímetro	control	23	1007,08	136,332517	8,989499	989,29551	1024,72092	722,541	1409,5159
	soro	26	897,8876	128,238825	7,922621	882,287231	913,4880137	597,938	1317,1484
	leptina	26	839,4141	153,3633870	9,3681599	820,969273	857,8590002	511,6955	1263,9596
	Total	76	910,291	155,5581084	5,6426856	899,214238	921,3684874	511,6955	1409,5159

Glândulas salivares maiores - parótidas (ácinos)

Distribuição:

Tests of Normality

	grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
área	control	,137	153	,000	,900	153	,000
	soro	,108	103	,005	,928	103	,000
	leptina	,121	174	,000	,925	174	,000
perímetro	control	,095	153	,002	,945	153	,000
	soro	,094	103	,025	,944	103	,000
	leptina	,086	174	,003	,964	174	,000

a. Lilliefors Significance Correction

A distribuição não é normal.

Análise não paramétrica Kruskal-Wallis:

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of area is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.
2	The distribution of perimetro is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

De acordo com esta, há diferença entre os grupos.

GLM multivariada para dados standardizados (ranks)

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) grupo	(J) grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Rank of area by grupo	soro	controlo	25,0000 ⁺	5,614167	,000	13,96516	36,03484
		leptina	-	4,881837	,032	-	-,90458
	controlo	soro	10,50000 ⁺	5,614167	,000	20,09542	-
		leptina	-	5,476163	,000	-	-
	leptina	soro	35,50000 ⁺	4,881837	,032	,90458	20,09542
		controlo	10,50000 ⁺	5,476163	,000	24,73641	46,26359
Rank of perimetro by grupo	soro	controlo	25,00000 ⁺	5,614172	,000	13,96515	36,03485
		leptina	-	4,881841	,032	-	-,90457
	controlo	soro	10,50000 ⁺	5,614172	,000	20,09543	-
		leptina	-	5,476168	,000	-	-
	leptina	soro	35,50000 ⁺	4,881841	,032	,90457	20,09543
		controlo	10,50000 ⁺	5,476168	,000	24,73640	46,26360

Alterações nas glândulas salivares provocadas por hiperleptinemia em modelo animal

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1940,261.

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

De acordo com este, os 3 grupos diferem uns dos outros.

Estatística descritiva:

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
área	contro	15	38631,01	13380,390	1081,740	36493,83	40768,20	18061,	100149,
	lo	3	96	45	45	16	77	00	00
	soro	10	34842,56	9433,5713	929,5174	32998,86	36686,25	18276,	67198,0
		3	31	3	0	97	65	00	0
	leptin	17	28899,96	11548,488	875,4886	27171,95	30627,97	11066,	74052,0
	a	4	55	60	6	11	99	00	0
	Total	43	33785,86	12517,921	603,6677	32599,35	34972,38	11066,	100149,
		0	98	66	9	52	43	00	00
perímetro	contro	15	793,3995	141,18539	11,41416	770,8487	815,9504	518,96	1377,74
	lo	3							
	soro	10	755,2031	105,37744	10,38315	734,6082	775,7981	565,50	1082,16
		3							
	leptin	17	683,3948	140,98147	10,68778	662,2995	704,4900	425,71	1119,74
	a	4							
	Total	43	739,7366	141,73914	6,83527	726,3018	753,1714	425,71	1377,74
		0							

Glândulas salivares maiores - submandibulares (ácinos)

- Avaliar se a distribuição é normal:

Tests of Normality^{a,c}

	grup	Kolmogorov-Smirnov ^b			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
área	1	,099	126	,004	,962	126	,001
	2	,111	152	,000	,959	152	,000
	3	,094	121	,010	,928	121	,000
perímetro	1	,069	126	,200 [*]	,989	126	,420
	2	,089	152	,005	,977	152	,013
	3	,076	121	,081	,967	121	,005

*. This is a lower bound of the true significance.

a. There are no valid cases for area when grupo = .. Statistics cannot be computed for this level.

b. Lilliefors Significance Correction

c. There are no valid cases for perímetro when grupo = .. Statistics cannot be computed for this level.

A distribuição não é normal, pelo que a comparação entre grupos tem que ser feita por testes não paramétricos:

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of area is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,583	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of perímetro is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,650	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, não há diferenças significativas entre os grupos, nem para as áreas nem para os perímetros.

Em termos de estatística descritiva:

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
área	1	1	45598,90	15054,29	1341,143	42944,61	48253,19	18382,0	96329,0
		2	48	458	15	60	35	0	0
		6							
	2	1	47365,80	14620,52	1185,880	45022,74	49708,87	23718,0	89890,0
5		92	002	77	73	12	0	0	
2									
3	1	47607,82	16920,07	1538,188	44562,32	50653,33	19864,0	113566,00	
	2	64	079	25	08	21	0	00	
	1								
	Total	399	46881,2331	15471,49197	774,54338	45358,5255	48403,9407	18382,0	113566,00
perímetro	1	1	860,0400	138,8008	12,36536	835,5674	884,5126	563,71	1279,07
		2		8					
		6							
	2	1	878,2013	135,5267	10,99267	856,4820	899,9206	617,87	1213,37
5			0						
2									
3	1	877,1480	148,7115	13,51923	850,3809	903,9152	608,00	1393,28	
	2		5						
	1								
	Total	399	872,1467	140,55331	7,03647	858,3135	885,9800	563,71	1393,28

Anexo 2

Tabela I. Resumos dos valores obtidos de concentração dos animais em estudo na glândula parótida

Parótida				
Grupo	Animal	Concentração (µg/ml) obtida nas Frações celulares (média ± erro pad)		
		Citosolica	membranar	mitocondrial
Leptina	6	638±69	1299±271	886±67
	7	3220±86	2716±87	2603±467
	8	4553±809,2	4914±925	3988±696
	13	2259±263	1781±259	3053±999
	25	1553±302	1693±287	1223±89
	28	2338±115	2714±296	2871±180
Soro	5	1212±152	2018±207	1741±476
	10	2043±77	3578±24	1743±559
	14	1708±108	3002±252	2697±66
	15	2258±490	1955±560	1837±432
	12	2614±335	2008±209	2435±729
	27	2530±288	1997±445	2652±381
Controlo	1	3542 ±765	3100±205	
	2	Sem amostra	Sem amostra	
	3	3297±478	3309±390	
	11	1227±160	1214±386	
	18	1231±639	1727±802	

Tabela II. Resumos dos valores obtidos de concentração dos animais em estudo na glândula submandibular/sublingual

Submandibular/sublingual				
Grupo	Animal	Concentração ($\mu\text{g/ml}$) obtida nas Frações celulares (média \pm erro pad)		
		Citosolica	membranar	mitocondrial
Leptina	6	1779 \pm 8	3107 \pm 355	2739 \pm 768
	7	2244 \pm 42	4490 \pm 185	2587 \pm 353
	8	2933 \pm 94	4490 \pm 508	2655 \pm 790
	13	2648 \pm 455	4209 \pm 421	1238 \pm 278
	25	3430 \pm 120	6650 \pm 424	3038 \pm 542
	28	2325 \pm 312	4068 \pm 56	2114 \pm 486
Soro	5	2853 \pm 514	6555 \pm 89	2236 \pm 298
	10	2816 \pm 422	4916 \pm 504	2562 \pm 732
	14	2817 \pm 70	5141 \pm 128	1613 \pm 563
	15	5387 \pm 456	7493 \pm 89	3210 \pm 656
	12	5488 \pm 379	9688 \pm 394	3699 \pm 395
	27	4767 \pm 723	8257 \pm 243	1238 \pm 276
Controlo	1	3258 \pm 228	4686 \pm 930	
	2	2756 \pm 277	6793 \pm 631	
	3	Sem amostra	Sem amostra	
	11	3985 \pm 189	5258 \pm 228	
	18	3154 \pm 200	6040 \pm 1235	

Anexo 3

Tabela III. Quantidades de proteína testadas na fração citosólica da parótida (R1, R2 e R3 – Determinação em triplicado, 1ª réplica, 2ª réplica e 3ª réplica respetivamente)

Animal 1 fração citosólica da Parótida					
Valores de abs a 530nm					
	Quantidade de proteína (µg)				
	0	1	1,5	2	2,5
R1	0,237	0,553	0,571	0,644	0,634
R2	0,240	0,532	0,582	0,656	0,661
R3	0,243	0,541	0,603	0,631	0,659
Média (abs)	0,240	0,542	0,585	0,644	0,651
[glucose] (µg/ml)		4,7	5,3	6,2	6,4

Tabela IV. Quantidades de proteína testadas para a fração citosólica da submandibular (R1, R2 e R3 – Determinação em triplicado, 1ª réplica, 2ª réplica e 3ª réplica respetivamente)

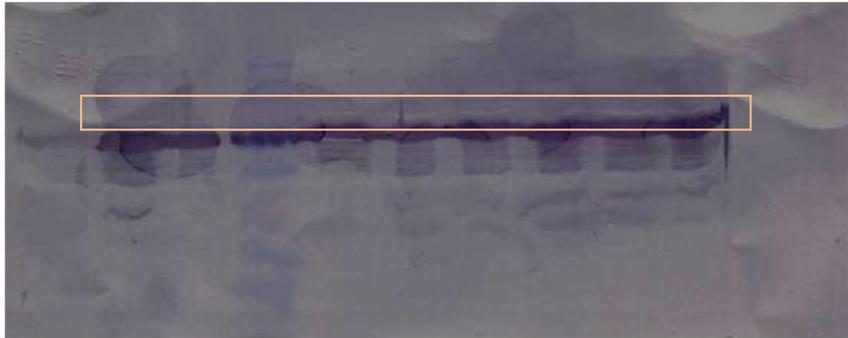
Animal 1 fração citosólica da Submandibular							
Valores de abs a 530nm							
	Quantidade de proteína (µg)						
	0	2	4	6	8	10	12
R1	0,235	0,245	0,26	0,269	0,302	0,319	0,364
R2	0,235	0,243	0,256	0,272	0,289	0,325	0,349
R3	0,237	0,25	0,259	0,28	0,306	0,314	0,336
Média (abs)	0,236	0,246	0,258	0,274	0,299	0,319	0,350
[glucose] (µg/ml)		0,08	0,27	0,51	0,91	1,23	1,73

Tabela V. Quantidades de proteína testadas para a fração mitocondrial da parótida (R1, R2 e R3 – Determinação em triplicado, 1ª réplica, 2ª réplica e 3ª réplica respectivamente)

Animal 1 fração mitocondrial da Parótida					
Valores de abs a 530nm					
	Quantidade de proteína (μg)				
	0	5	15	25	35
R1	0,238	0,247	0,269	0,295	0,31
R2	0,237	0,244	0,266	0,298	0,324
R3	0,238	0,253	0,259	0,287	0,327
Média (abs)	0,238	0,248	0,265	0,293	0,320
[glucose]		0,08	0,34	0,79	1,21

Anexo 4

Membranas obtidos através da técnica de western-blotting



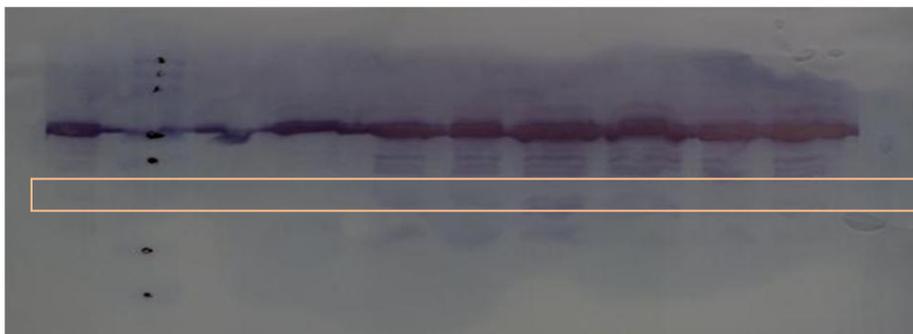
6(1) – 5(1) – 7(1) – MW – 8(1) – 10(1) – 13 (1) – 14(1) – 14 (2) – 1(2)

Figura A. Fração citosólica na marcação com alfa-amilase na glândula parótida



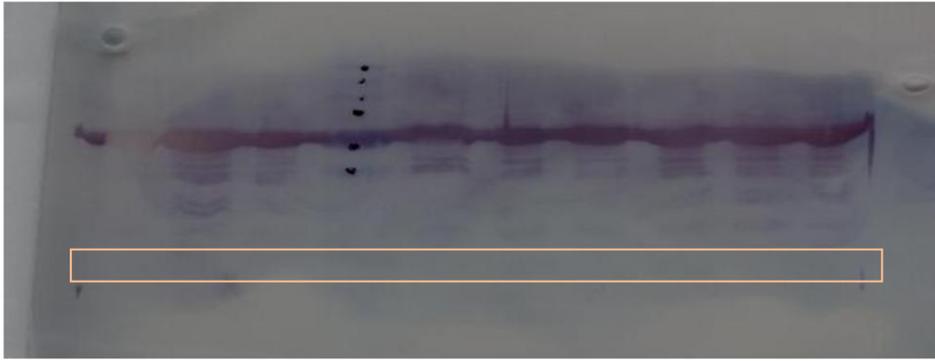
5(2) – MW – 8(2) – 6(1) – 13(2) – 7(1) – 5(1) – 8(1) – 10(1) – 11(2)

Figura B. Fração citosólica na marcação com alfa-amilase na glândula parótida (continuação Figura A)



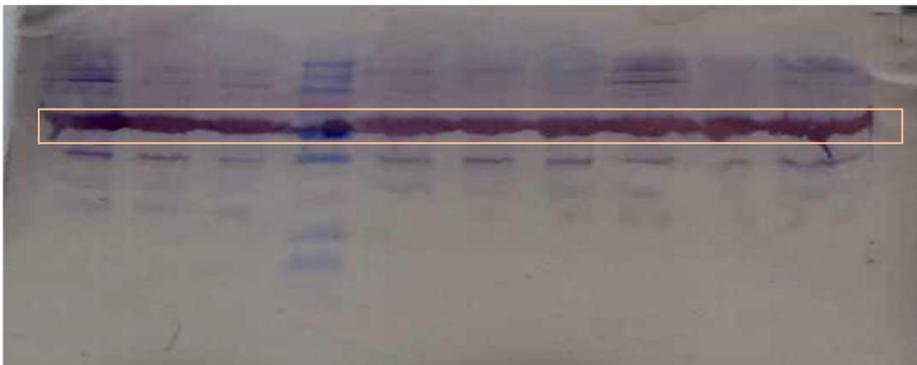
5(2) – MW – 8(2) – 6(1) – 13(2) – 7(1) – 5(1) – 8(1) – 10(1) – 11(2)

Figura C. Fração citosólica com marcação Beta-actina na glândula parótida



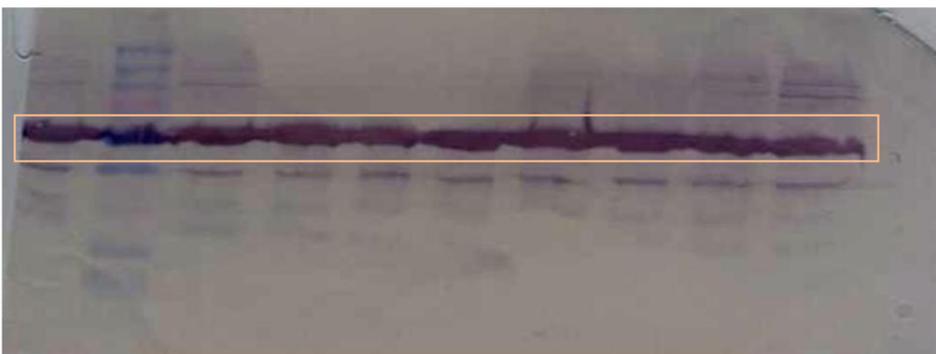
6(1) – 5(1) – 7(1) – MW – 8(1) – 10(1) – 13 (1) – 14(1) – 14 (2) – 1(2)

Figura D. Fração citosólica com marcação Beta-actina na glândula parótida (continuação Figura C)



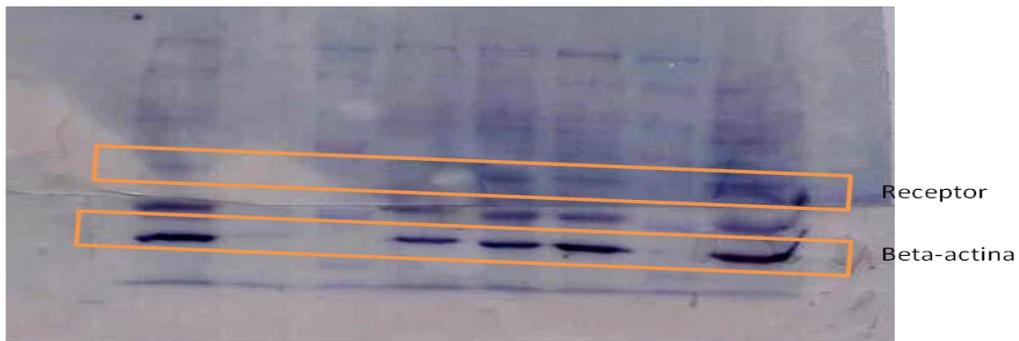
14(2) – 6(1) – 10(1) – MW – 7(1) – 12(1) – 8(1) – 1(2) – 13(1) – 5(2)

Figura E. Fração mitocondrial com marcação alfa-amilase



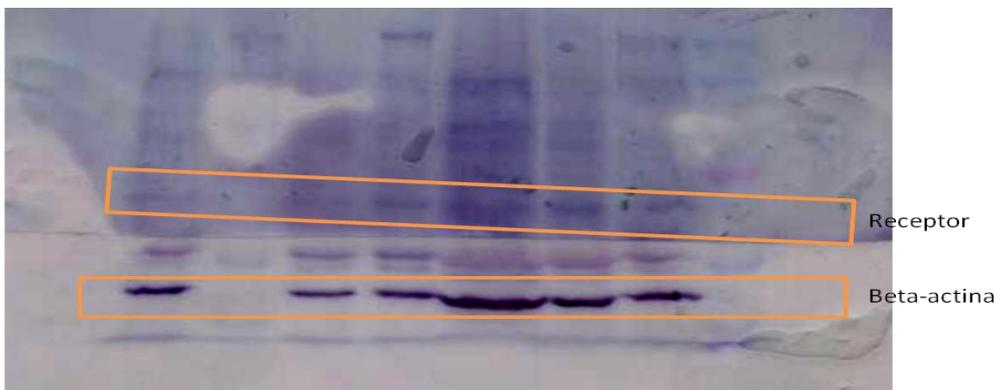
6(1) – MW – 10(1) – 7(1) – 14(1) – 8(1) – 1(2) – 13(1) – 5(2) – 11(2)

Figura F. Fração mitocondrial com marcação alfa-amilase (continuação figura E)



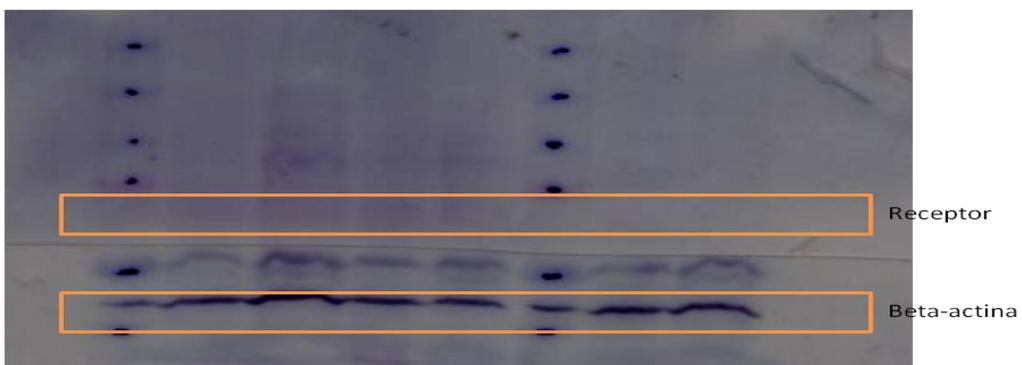
X - X - 13(2) - 8(2) - MW - 5(2) - 14(2) - 11(2) - MW - 13(1)

Figura G. Fração membranária marcada na glândula Parótida



1(2) - MW - 14(1) - 10(1) - 8(1) - 7(1) - 6(1) - MW

Figura H: Fração membranária marcada na glândula Parótida (continuação Figura G)



X - MW - 14(2) - 5(2) - 13(2) - 7(1) - MW - 8(1) - 10(1)

Figura I: Fração membranária marcada na glândula Submandibular