

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NÁVYLLA CANDEIA DE MEDEIROS

**OS SENSORES DE GLICOSE T1R2 E T1R3 REGULAM A TRANSLOCAÇÃO DO
COTRANSPORTADOR Na^+ /GLICOSE/ÁGUA SGLT1 EM GLÂNDULA SALIVAR:
REGULAÇÃO DA SECREÇÃO SALIVAR NO DIABETES MELLITUS**

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

MACEIÓ-AL

2014

NÁVYLLA CANDEIA DE MEDEIROS

**OS SENSORES DE GLICOSE T1R2 E T1R3 REGULAM A TRANSLOCAÇÃO DO
COTRANSPORTADOR Na^+ /GLICOSE/ÁGUA SGLT1 EM GLÂNDULA SALIVAR:
REGULAÇÃO DA SECREÇÃO SALIVAR NO DIABETES MELLITUS**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde, da
Universidade Federal de Alagoas, em
cumprimento às exigências para a obtenção do
título de Mestre pela referida Instituição.**

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva

MACEIÓ- AL

201

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Maria Auxiliadora G. da Cunha

M488s Medeiros, Návylla Candeia de Medeiros.
Os sensores de glicose T1R2 e T1R3 regulam a translocação do cotransportador Na⁺ /glicose/água SGLT1 em glândula salivar : regulação da secreção salivar no diabetes mellitus / Návylla Candeia de Medeiros. – 2014.
68 f. ; il.

Orientador: Robinson Sabino da Silva.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 60-68.

1. Sensor de glicose. 2. T1R2/T1R3. 3. SGLT1. 4. GLUT2. 5. Transporte de água. I. Título.

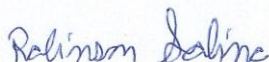
CDU: 616.379-008.64

Folha de Aprovação

Návylla Candeia de Medeiros

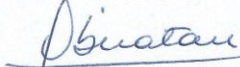
Os sensores de glicose T1R2 e T1R3 regulam a translocação do cotransportador Na⁺/glicose/água (SGLT1) em glândula salivar: regulação da secreção salivar no diabetes mellitus

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 11 de abril de 2014.



Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva (Orientador)

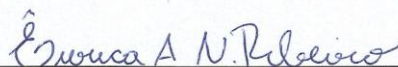
Banca Examinadora



Prof. Dr. Ubiratã Fabres Machado – (USP)



Prof.^a Dr.^a Salette Smaniotto – (UFAL)



Prof.^a Dr.^a Érica Adélia Nogueira Ribeiro - (UFAL)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular-LBC e no Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa - LNFI, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ ICBS, da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, sob orientação do Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva.

Dedico esta conquista a Deus, por ter me dado forças de realizar esse trabalho que faz parte da concretização de um grande sonho.

A meus pais, Eustáquio e Rúbia, e meu namorado Thiago Fernandes, que são as pessoas que mais incentivam, apoiam e acreditam nos meus objetivos; e a todos que acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo em todos os momentos dessa árdua e edificante trajetória. Agradeço cada dia por toda fé, força, foco, perseverança e paciência que sempre estiveram comigo. Por isso, a Ti toda honra e glória.

À minha família, em especial a meus pais, Eustáquio e Rúbia, que são grandes fortalezas em minha vida, pois estiveram sempre ao meu lado, em todos os momentos, fossem eles fáceis ou difíceis. Vocês são os grandes responsáveis por todas as vitórias e conquistas da minha vida, dando-me apoio, carinho e compreensão que sempre precisei, fazendo-me uma pessoa mais forte e determinada. Grata por existirem. A vocês, todo o meu amor e gratidão para sempre. Amo vocês!

A meu namorado Thiago Fernandes, que ao longo de todos esses anos que estamos juntos, sempre acreditou e torceu por mim, ajudando-me a enfrentar cada desafio e comemorando cada vitória. Tê-lo ao meu lado ao longo dessa jornada foi essencial para que eu tivesse forças para alcançar meus objetivos. Você é meu pilar de sustentação, diante de tantas dificuldades, fazendo-me superar cada uma. A você todo meu amor e gratidão.

Aos meus tios, José, Marinalda, Everaldo e Maria, por toda ajuda e por sempre apoiarem minhas decisões em todos os momentos da minha vida. E a meus primos que são meus grandes amigos e incentivadores, em especial, Taciana, Mariana e Catarinne. Foi estimulante ver a satisfação e o apoio de todos quando souberam que eu iria cursar meu mestrado na Universidade Federal de Alagoas.

À Hilda Albuquerque, por todo apoio, amor e carinho ao longo dessa trajetória e por tudo que a senhora fez por mim. Serei eternamente grata.

Ao meu orientador, prof. Robinson Sabino, pela competência com que exerce seu trabalho, pela oportunidade que me deu de realizar mais esta etapa na minha vida profissional, por todos os ensinamentos e paciência comigo. A você toda minha consideração e admiração.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde que colaboraram intensamente para a realização desse grande sonho. Em especial aos que tenho carinho e admiração profunda: Salete, Silvana, Emiliano e Olagide que além de abrirem as portas dos seus laboratórios, contribuiram imensamente no meu processo de aprendizagem.

A meus eternos professores de graduação, hoje meus amigos George Luiz e Priscila Rodrigues, pessoas que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos e decisões importantes da minha vida. Vocês foram muito importantes na minha caminhada. A vocês todo meu carinho, admiração e consideração.

À família do Laboratório de Biologia Celular, grandes amigos que contribuíram com a minha caminhada, aconselhando-me ou ajudando em cada experimento. São pessoas que sempre me estenderam a mão e se preocuparam com minha felicidade. Foi muito gratificante poder contar com vocês ao longo dessa jornada: Fernanda, Larissa, Rebeqa, Jamylle, Carol, Yngrid, Almair, Jennifer, Isabela Maria, Laís, Clarice, Iana, Dayse, Fagner, Marvin, Noé, Alex, Rafael, Paulinho, Altair e Samário. A vocês todo meu amor e consideração.

À família do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa – Tales, Igor, Polliane e Ana Luiza – por toda contribuição na realização dos experimentos e em todas as discussões científicas que tivemos. Sou grata a Deus por tê-los em minha vida.

A meus amigos da turma Ciências da Saúde 2012, por tudo que passamos juntos durante esse tempo. Cada experiência, disciplinas, risadas, comemorações, conselhos e principalmente a amizade de cada um de vocês foi muito significativa no meu processo de adaptação em Maceió. Valeu à pena passar tudo isso. Nunca irei esquecer o que fizeram por mim. Amo cada um de uma maneira especial.

Em especial a Larissa e Rebeca, por todos os conselhos e amizade incondicional que levarei por toda à vida. A Fernanda e Tales que estiveram comigo em todos os momentos como verdadeiros irmãos e me presentearam também com suas lindas famílias que me dão tanto amor. A Igor por toda força, confiança, companheirismo e por ser um amigo tão leal. À Mykaella e Evelin, por acreditarem em mim, dando-me sempre forças e pregando a palavra de Deus para me confortar. À Jamylle e Carol, por toda ajuda e conselhos valiosos que me deram. À Polliane, por toda ajuda e palavras de incentivo. A vocês, meus amigos, todo meu amor, amizade e gratidão para sempre. Grata por existirem. Amo vocês!

À minha amiga-irmã Gisele Braz, por seu apoio e incentivo indescritível. Fui presenteada por Deus com sua amizade. Obrigada irmã, por ter se feito tão presente mesmo estando tão longe. E aos demais amigos com quem levo um laço de amizade para toda a vida: Thiago Hanney, Larissa Karine, Iran Palmeira e Priscila Vasconcelos, também dedico essa vitória. Grata pela torcida, amizade e compreensão.

À Chiara por toda ajuda e apoio, meu muito obrigada.

A Universidade Federal de Alagoas, por seu apoio institucional.

Aos órgãos de fomento, CNPq, Capes e FAPEAL, pelo apoio financeiro que proporcionaram a concretização desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização desse sonho, a vocês dedico os meus sinceros agradecimentos.

“Quase tudo é possível quando se tem dedicação e habilidade. Grandes trabalhos são realizados não pela força, mas pela perseverança.”

(Autor desconhecido)

RESUMO

O cotransportador Na⁺/glicose/água SGLT1 localizado na membrana luminal de células ductais (MLCD) de glândulas salivares pode ser ativado pela atividade simpática via receptor β-adrenérgico-adenilatociclase-PKA. Foi demonstrado que o diabetes promove a diminuição da atividade simpática para as glândulas salivares e aumento da expressão do SGLT1 na MLCD, o que se correlaciona com redução do fluxo salivar. Nossa hipótese é de que nas células ductais, ocorre uma via paralela de ativação da PKA pela presença de sensores de glicose da família do GPCR 1. O presente estudo buscou avaliar a expressão subcelular dos sensores de glicose T1R2/T1R3 e do transportador de glicose GLUT2 em glândulas salivares e determinar o papel destes sensores na translocação do SGLT1 em glândulas submandibulares por meio de microinjeção de glicose na artéria submandibular. Além disso, foi avaliado o efeito da inibição de SGLTs nos ductos salivares por meio de microinjeção intraductal de florizina buscando avaliar seu papel no fluxo e na concentração de glicose salivar. Foram utilizados ratos Wistar não diabéticos (ND), diabéticos tratados com salina (DS) ou insulina (DI). O diabetes foi induzido 28 dias antes do estudo (aloxana, 40 mg/kg, i.v.). A partir do 21º dia os animais foram tratados durante 7 dias consecutivos com salina ou insulina. No 28º dia, os ratos foram anestesiados (pentobarbital sódico 60 mg/kg, i.p.) para a realização da microinjeção intraductal de salina ou florizina. Em seguida, a saliva foi coletada durante 10 minutos sob estímulo de pilocarpina (4 mg/kg, i.p.). Em outro conjunto de ratos, as glândulas submandibulares foram removidas e processadas para análise das proteínas T1R2, T1R3 e GLUT2 por imunofluorescência. Em um terceiro conjunto de ratos, foi administrado solução concentrada em glicose ou salina na artéria submandibular e avaliado a expressão subcelular do SGLT1 por imunofluorescência. Os resultados foram expressos em média ± EPM e comparados com ANOVA- Newman-Keuls/ teste T student/ correlação de Pearson (P < 0,05). A glicemia de DS foi aumentada (P < 0,05) em relação à ND e DI. Os sensores de glicose T1R2 e T1R3 e o transportador de glicose GLUT2 foram descritos, pela primeira vez, na membrana basolateral de células ductais da glândula submandibular (GS). Após a microinjeção de glicose, a análise por imunofluorescência para o SGLT1 demonstrou aumento na marcação desta proteína na MLCD da GS. A microinjeção de florizina aumentou (P < 0,05) o fluxo salivar em ND (47±5 µl) e DS (28±3 µl) comparado com o grupo que recebeu microinjeção de salina (ND:22±3 µl; DS:8±2 µl). A florizina não alterou a concentração de glicose salivar quando comparada com os grupos salina. No entanto, a florizina promoveu aumento (P < 0,05) da excreção de glicose em DS-florizina e DI-florizina quando comparados com DS-salina e DI-salina, respectivamente. Nossos resultados indicam que o aumento da presença de glicose no líquido extracelular de diabéticos pode aumentar a estimulação de sensores T1R2 e T1R3, o que promove aumento da translocação de SGLT1 para MLCD de GS. Sugerimos assim que a reabsorção de glicose salivar é mediada pelo SGLT1 na membrana luminal e pelo GLUT2 na membrana basolateral de células ductais. Além disso, a captação de água pelo SGLT1 pode ser um mecanismo importante para redução da secreção salivar no diabetes.

Palavras-chaves: Sensor de glicose. T1R2/T1R3. SGLT1. GLUT2. Transporte de água.

ABSTRACT

The Na⁺/glucose/water cotransporter SGLT1 in the luminal membrane of ductal cells (MLCD) in salivary glands can be activated by the sympathetic activity via β -adrenergic receptor-adenylate cyclase-PKA. It has been shown that diabetes promotes a decrease of sympathetic activity to the salivary glands and an increase in SGLT1 expression in MLCD, which correlates with reduced salivary flow. Our hypothesis is that occurs a parallel activation via of PKA by the presence of glucose sensors of the GPCR family 1 in the ductal cells. The present study sought to evaluate the subcellular expression of glucose sensors T1R2/T1R3 and glucose transporter GLUT2 in salivary glands and determine the role of these sensors in the translocation of SGLT1 in submandibular glands by microinjection of glucose in the submandibular artery. Furthermore, we evaluated the effect of inhibition of SGLTs in salivary ducts by intraductal microinjection of phlorizin seeking to evaluate their role in the flow and salivary glucose concentration. Were used rats Wistar nondiabetic (ND), diabetics treated with saline (DS) or insulin (DI). The diabetes was induced 28 days before the study (alloxan, 40 mg/kg, iv). From the 21st day, the animals were treated for 7 consecutive days with saline or insulin. On day 28, the rats were anesthetized (sodium pentobarbital 60 mg/kg, i.p.) to perform the intraductal microinjection of phlorizin or saline. The saliva was collected during 10 minutes under pilocarpine stimulation (4 mg/kg, ip). In another set of rats, submandibular glands were removed and processed for analysis of T1R2, T1R3 and GLUT2 protein by immunofluorescence. In a third group of rats, was administered a concentrated glucose solution or saline in the submandibular artery and evaluated the subcellular expression of SGLT1 by immunofluorescence. The results were expressed as mean \pm SEM and compared with ANOVA- Newman-Keuls/ Test T student/ Pearson correlation ($P < 0,05$). The glycemia of DS was increased ($P < 0,05$) compared to ND and DI. The glucose sensors T1R2 and T1R3 and the glucose transporter GLUT2 were described for the first time, in the basolateral membrane of ductal cells in submandibular glands (GS). After the microinjection of glucose, the immunofluorescence analysis for SGLT1 showed an increasing in the marking of this protein in MLCD of GS. The microinjection of phlorizin increased ($P < 0,05$) the salivary flow in ND ($47 \pm 5 \mu\text{l}$) and DS ($28 \pm 3 \mu\text{l}$) compared with the group that received microinjection of saline (ND: $22 \pm 3 \mu\text{l}$, DS: $8 \pm 2 \mu\text{l}$). The phlorizin has not change salivary glucose concentration when compared to the saline groups. However, phlorizin promoted an increase ($P < 0,05$) in salivary glucose excretion from DS-phlorizin and DI phlorizin as compared with ND-saline and DI-saline, respectively. The results indicate that the increasing of the presence of glucose in the extracellular fluid of diabetic patients may increase the stimulation of the sensors, T1R2 and T1R3, which promotes the increase in the translocation of SGLT1 to MLCD in GS. We suggest that the reabsorption of glucose is mediated by SGLT1 on the luminal membrane and by the GLUT2 in the basolateral membrane of ductal cells. Moreover, water uptake by SGLT1 could be an important mechanism for the reduction of salivary secretion in diabetes.

Key-words: Glucose sensors. T1R2/T1R3. SGLT1. GLUT2. Water transport.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Histologia da glândula salivar.....	19
FIGURA 2	Formação do fluido salivar.....	21
FIGURA 3	Estrutura secundária da proteína SGLT1.....	24
FIGURA 4	Representação esquemática dos receptores de sabor doce T1R2 e T1R3.....	26
FIGURA 5	Grupos experimentais estudados.....	31
FIGURA 6	Modelo experimental do estudo.....	32
FIGURA 7	Modelo esquemático de canulação intraductal da glândula submandibular seguido de microinfusão de florizina ou salina.....	33
FIGURA 8	Modelo esquemático de canulação da artéria submandibular com injeção de solução glicosada.....	34
FIGURA 9	Peso corpóreo e Variação de peso ponderal	37
FIGURA 10	Concentração de glicose plasmática.....	38
FIGURA 11	Peso das Glândulas salivares.....	39
FIGURA 12	Localização da proteína T1R2 no ducto da glândula submandibular....	40
FIGURA 13	Localização da proteína T1R3 no ducto da glândula submandibular....	41
FIGURA 14	Localização do cotransportador de sódio/glicose/água SGLT1 na glândula submandibular.....	42
FIGURA 15	Histologia da glândula submandibular após injeção de glicose ou salina na artéria glandular.....	43
FIGURA 16	Fluxo Salivar.....	44
FIGURA 17	Concentração de glicose salivar.....	45
FIGURA 18	Relação do fluxo salivar com a concentração de glicose salivar.....	47
FIGURA 19	Relação da glicemia com a concentração de glicose salivar.....	48
FIGURA 20	Localização da proteína GLUT2 no ducto da glândula submandibular.	49
FIGURA 21	Modelo ilustrativo da ativação dos sensores de glicose T1R2/ T1R3 e do mecanismo de reabsorção de glicose e água via SGLT1 e GLUT2 em células de ducto estriado de glândulas submandibulares.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Excreção de glicose salivar.....	46
----------	----------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DI	Ratos diabéticos tratados com insulina
DI-Florizina	Ratos diabéticos tratados com insulina com injeção intraductal de florizina
DI-Salina	Ratos diabéticos tratados com insulina com injeção intraductal de salina
DS	Ratos diabéticos tratados com salina
DS-Florizina	Ratos diabéticos tratados com salina com injeção intraductal de florizina
DS-Salina	Ratos diabéticos tratados com salina com injeção intraductal de salina
GLUT1	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 1
GLUT2	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 2
GLUT4	Transportadores de glicose por difusão facilitada tipo 4
GLUTs	Família dos transportadores de glicose por difusão facilitada
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GSM	Glândula submandibular
i.p.	Intraperitoneal
Kb	Kilobases
M₃	Receptores muscarínicos tipo 3
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
µm	Micrômetro
ND	Ratos não-diabéticos
ND-Florizina	Ratos não-diabéticos com injeção intraductal de florizina
ND-Salina	Ratos não-diabéticos com injeção intraductal de salina
nm	Nanômetros
PBS	Tampão Fosfato Salina
PKA	Proteína cinase A
PLC	Fosfolipase C

SGLT1	Cotransportador Na ⁺ / glicose/ água tipo 1
SGLT2	Cotransportador Na ⁺ / glicose tipo 2
SGLTs	Família dos cotransportadores de glicose acoplados ao sódio
SLC5A1	Gene que codifica a proteína SGLT1
SLC5A2	Gene que codifica a proteína SGLT2
T1R	Sensores de glicose (Família de receptores de sabor doce)
T1R1	Sensor de glicose tipo 1
T1R2	Sensor de glicose tipo 2
T1R3	Sensor de glicose tipo 3
TA	Temperatura ambiente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	Glândulas salivares.....	19
3.2	Saliva.....	20
3.2.1	Formação da saliva.....	20
3.2.2	Regulação do Fluxo salivar.....	21
3.2.3	Funções da Saliva.....	22
3.3	Transportadores de glicose.....	23
3.4	Sensores de glicose.....	25
3.5	Diabetes Mellitus.....	26
3.6	Regulação dos GLUTs e SGLTs em glândulas salivares e sua relação com Diabetes Mellitus.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1	Animais.....	30
4.2	Modelo experimental.....	31
4.3	Peso corporal.....	32
4.4	Coleta de Amostras.....	32
4.4.1	Coleta das glândulas salivares.....	32
4.4.2	Coleta de saliva associada a microinfusão de drogas no ducto glandular.....	33
4.4.3	Administração de solução glicosada (50%) através da canulação da artéria submandibular.....	34
4.4.4	Coleta do sangue.....	35
4.5	Avaliação das concentrações de glicose plasmática e salivar.....	35
4.6	Análise histológica das glândulas submandibulares após microinjeção de glicose ou salina na artéria glandular.....	35
4.7	Imunofluorescência.....	36
4.8	Análise dos Resultados.....	36
5	RESULTADOS.....	37

5.1	Parâmetros Gerais de Caracterização do Diabetes.....	37
5.1.1	Peso corpóreo.....	37
5.1.2	Concentração de glicose plasmática.....	38
5.1.3	Pesos das glândulas salivares.....	38
5.2	Detecção por imunofluorescência do sensor de glicose T1R2 e T1R3 em glândula submandibular.....	39
5.3	Translocação de SGLT1 após microinjeção de glicose na artéria da glândula submandibular	42
5.4	Avaliação histológica das glândulas submandibulares após microinjeção de solução com glicose ou salina na artéria glandular.....	43
5.5	Análise do Fluxo salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular.....	44
5.6	Concentração de glicose salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular.....	45
5.7	Excreção de glicose salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular.....	46
5.8	Relação do fluxo salivar com a concentração de glicose após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular.....	46
5.9	Relação da glicemia com a concentração de glicose salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular.....	47
5.10	Detecção por imunofluorescência do transportador de glicose GLUT2 em glândula submandibular.....	48
6	DISCUSSÃO.....	50
6.1	Caracterização dos animais e de suas glândulas salivares.....	50
6.2	Detecção dos sensores de glicose T1R2 e T1R3 e sua participação na translocação do SGLT1.....	51
6.3	Fluxos de água e glicose em ductos de glândulas salivares	53
7	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

A importância da saliva para a saúde oral é bem conhecida e suas múltiplas funções ocorrem pela sua fluidez e por componentes específicos (proteínas, íons e glicose) (THAYSEN; THORN; SCHWARTZ, 1954). A glicose é a principal fonte de energia para os organismos eucariontes, e tem papel central no metabolismo e homeostasia celular (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004). A glicose não atravessa a bicamada lipídica da membrana plasmática, pois esta membrana é impermeável para moléculas hidrofílicas. O processo de transporte de glicose é um processo coordenado que envolve duas classes de transportadores: os transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e os cotransportadores Na^+ /Glicose (SGLTs) (BELL et al., 1990; CARRUTHERS, 1990).

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia inapropriada e provoca diversas alterações na cavidade oral do paciente. O diabetes também promove uma série de alterações salivares como: a redução do fluxo salivar (CONNER et al., 1970), as alterações na composição da saliva, o aumento da concentração de glicose (CAMPBELL, 1965; REUTERVING, 1986) e a diminuição da concentração de proteínas (ANDERSON et al., 1993).

Nas glândulas salivares, já foi demonstrado que o diabetes promove a diminuição da atividade simpática, o que é correlacionada com a redução da expressão de proteína cinase A (PKA) (SABINO-SILVA et al., 2010a). Além disso, foi demonstrado em animais diabéticos, que a proteína cotransportadora Na^+ /glicose/água tipo 1 (SGLT1), que transporta 2 íons Na^+ e 1 molécula de glicose acoplados à 264 moléculas de água (ZEUTHEN, 2000), está aumentada na membrana luminal de células ductais de glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2009). Considerando que o aumento da expressão da SGLT1 ductal tem potencial para reduzir o fluxo salivar, buscaremos desvendar o mecanismo molecular envolvido neste processo que ainda é desconhecido.

Em enterócitos foi descrito a presença dos sensores de glicose T1R2 e T1R3, um heterodímero da família do GPCR1 (receptor acoplado a proteína G do tipo 1), que estimula a via da PKA. Este sensor de glicose inicia uma cascata de sinalização, que leva ao aumento da expressão do SGLT1 intestinal (MARGOLSKEE et al., 2007). Acreditamos desta forma, que nas células ductais de ratos diabéticos, ocorre uma via paralela de ativação da PKA por um GPCR1.

Apesar do grande avanço no conhecimento da expressão de transportadores de glicose em glândulas salivares ainda são necessários estudos funcionais para caracterizar a presença e

papel destas proteínas na reabsorção de água e glicose glandular. As investigações sobre a concentração de glicose salivar exploram a possibilidade do controle do diabetes ser realizado por um método não-invasivo, rápido e indolor, através da saliva. Porém, mesmo com o aumento da concentração de glicose salivar identificado em diabéticos, sabe-se que a glicemia plasmática apresenta fraca correlação com a concentração de glicose salivar. Assim, buscamos identificar e avaliar o papel funcional dos sensores de glicose na translocação do SGLT1 em células ductais de glândulas salivares e avaliar o papel da reabsorção de água e glicose em células ductais promovida pelo SGLT1.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e avaliar o papel funcional dos sensores de glicose na translocação do SGLT1 em células ductais de glândulas salivares. Além disso, avaliar os fluxos de água e glicose na glândula salivar por meio da ação da florizina, um inibidor de SGLTs.

2.2 Objetivos específicos

Utilizando animais não-diabéticos e diabéticos tratados com insulina ou salina, propomos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Identificar e avaliar a localização subcelular das proteínas sensoras de glicose T1R2 e T1R3 no ducto da glândula submandibular;
- 2) Avaliar a localização subcelular da proteína SGLT1 em células ductais de glândula submandibular após microinjeção de solução glicosilada na artéria da glândula submandibular;
- 3) Avaliar o papel da reabsorção de água promovida pelo SGLT1 em ductos salivares por meio da técnica de microinfusão intraductal de florizina sob estímulo de secreção salivar com pilocarpina;
- 4) Avaliar a taxa de glicose excretada após microinfusão intraductal de florizina ou salina sob estímulo de secreção salivar com pilocarpina;
- 5) Avaliar a correlação entre a glicose salivar e a glicemia plasmática;
- 6) Identificar e avaliar a localização subcelular do transportador de glicose GLUT2 no ducto da glândula submandibular.

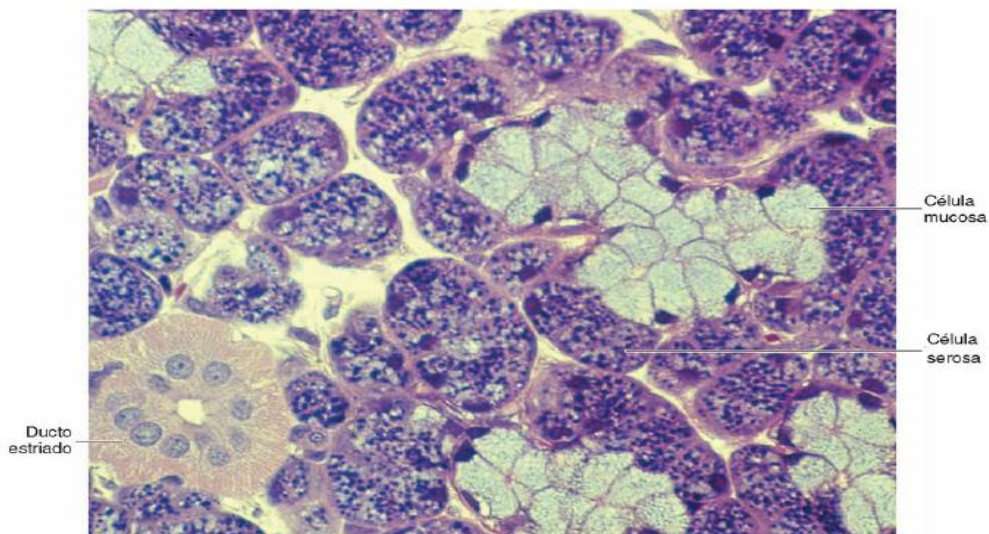
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Glândulas Salivares

As glândulas salivares são constituídas por glândulas salivares principais (parótida, submandibular e sublingual) e por numerosas glândulas menores (labiais, bucais, palatinas e glossopalatinas). As secreções de ambas as glândulas maiores e menores junto com o exsudato gengival, rico em microorganismos e detritos celulares, formam a saliva mista ou fluido oral (EDGAR, 1990; HOE et al., 1997).

Os tipos de células encontradas nas glândulas salivares são células acinosas, mioepiteliais e ductais. As células acinosas, onde ocorre a formação da saliva primária, determinam o tipo de secreção produzida pelas glândulas salivares. A secreção salivar pode ser classificada como serosa, mucosa ou mista (Figura 1). A secreção serosa, contém alfa-amilase salivar e possui organelas para síntese, armazenamento e secreção de proteínas. A secreção mucosa possui as mesmas funções da secreção serosa, porém ela contém mucina, que possui função lubrificante. O muco acumulado no ácino mucoso, comprime o núcleo e o retículo endoplasmático contra a membrana celular (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001). As secreções serosas são produzidas principalmente pela glândula parótida; secreções mucosas pelas glândulas menores; e secreções mistas (serosas e mucosas) pelas glândulas submandibular e sublingual (EDGARD, 1990; APS; MARTENS, 2005).

FIGURA 1 – Histologia da glândula salivar submandibular.



Fotomicrografia de glândula submandibular. Presença de células serosas (escuras) formando semiluas e células mucosas (claras) agrupadas em arranjo tubular, nesta glândula tubular composta. Coloração pararrosanilina e azul de toluidina. Aumento médio. Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2011.

Os ácinos estão conectados ao sistema de ductos que é formado por ductos: intercalares, estriados e excretorios, cada um com diferentes estruturas e funções. Os ductos intercalares, onde inicialmente passa a saliva primária, são os menores e são delimitados por um epitélio cuboidal simples, com núcleo disposto centralmente e uma pequena porção de citoplasma (TANDLER et al., 1998). Os ductos estriados, que recebem a saliva primária dos ductos intercalares, constituem a maior parte do sistema de ductos. Estes ductos são constituídos por uma única camada de células colunares, as quais possuem núcleo centralizado com citoplasma claro acidofílico. Uma importante função das células ductais estriadas são as modificações da saliva primária pela reabsorção e secreção de eletrólitos (TANDLER et al., 2001). Os ductos excretorios estão localizados na porção final do sistema de ductos e apresentam maior diâmetro que os demais ductos, com epitélio pseudoestratificado com células colunares estendendo-se da lâmina basal ao lúmen ductal. A estrutura desse ducto modifica-se à medida que ele se aproxima da abertura da mucosa oral, onde o fluido oral será finalmente eliminado. (TANDLER; PINKSTAFF; PHILLIPS, 2006). Este sistema ductal permite que a saliva seja direcionada para a cavidade oral (APS; MARTENS, 2005).

3.2 Saliva

A saliva é um fluido misto, viscoso, com pH levemente ácido (pH 6-7) contendo água, mucinas, sais orgânicos, proteínas, íons e glicose (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; LÖFGREN et al., 2012). O fluxo médio diário de saliva varia entre 1 e 1,5 litros. A contribuição de cada tipo de glândula pode variar muito de acordo com o estímulo. No estado basal a contribuição das diferentes glândulas no fluxo salivar é: 65% da submandibular, 20% da parótida, 7% a 8%, da sublingual, e menos de 10% das numerosas glândulas menores (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; GREABU et al., 2009).

3.2.1 Formação da saliva

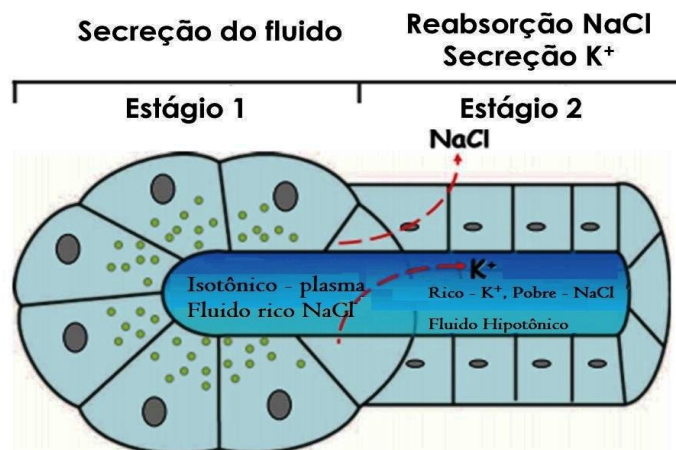
A formação da saliva envolve dois estágios (Figura 2). Inicialmente um fluido primário, abundante em íons Na^+ e Cl^- , isotônico em relação ao plasma, é secretado pelas células acinosas das glândulas salivares no lúmen (estágio 1). Posteriormente, quando o fluido

primário passa pelos ductos ocorre reabsorção de íons Na^+ e Cl^- , e secreção de K^+ e HCO_3^- (estágio 2) (THAYSEN; THORN; SCHWARTZ, 1954).

Como a reabsorção de Na^+ e Cl^- excede a secreção de K^+ e HCO_3^- e fisiologicamente espera-se não ocorrer significativa movimentação de água no sistema ductal, a saliva final secretada na cavidade oral é hipotônica em relação ao plasma (TURNER; SUGIYA, 2002; MELVIN et al., 2005).

A concentração de glicose no líquido extracelular é correlacionada ao plasma e a concentração de glicose na saliva presente na cavidade oral é significativamente menor do que a encontrada no plasma (MANDEL et al., 1961; LANGLEY et al., 1963; TAKAI, YOSHIDA; KAKUDO, 1983).

FIGURA 2 - Formação do fluido salivar.



Modelo adaptado de CATALÁN et al., 2009.

3.2.2 Regulação do Fluxo salivar

A secreção salivar é um processo controlado por um arco reflexo formado por uma parte aferente e outra eferente. A parte aferente é formada pelos receptores e nervos que conduzem os impulsos, gerados por estímulos da mastigação, gustação e olfação, até o sistema nervoso central. A parte eferente é formada por nervos do sistema nervoso simpático e parassimpático que inervam as glândulas separadamente (GARRETT, 1987). O papel do sistema nervoso simpático e parassimpático na modulação do fluxo e composição da saliva tem sido bastante estudado. O estímulo parassimpático gera uma saliva abundante em volume (GARRETT et al., 1987; PEDERSEN et al., 2002). Já o estímulo simpático para as glândulas salivares, pela estimulação elétrica das vias eferentes (CARPENTER et al., 1998), ou pela

aplicação de agonistas adrenérgicos (VATTA et al., 2002), resulta em uma secreção de baixo fluxo, viscosa e rica em proteínas (GARRETT et al., 1987).

A parte aquosa da saliva é estimulada principalmente pela interação de agonistas parassimpático (acetilcolina) e simpático (noradrenalina e adrenalina) com receptores muscarínicos tipo 3 (M_3) e receptores alfa-1 adrenérgicos ($\alpha-1$), respectivamente. Em ambos os casos, o processo de formação da parte aquosa da saliva é regulado pela concentração de Ca^{2+} intracelular pela via do diacilglicerol e inositol-3- fosfato (ZEUTHEN et al., 2000).

3.2.3 Funções da Saliva

A importância da saliva para a saúde oral é bem conhecida e suas múltiplas funções ocorrem pela sua fluidez e por componentes específicos. Na cavidade oral a saliva desempenha diversas funções: digestiva, antibacteriana, de tamponamento, lubrificantes e manutenção da integridade dos dentes (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

O fluido salivar umedece o alimento e auxilia na mastigação e formação do bolo alimentar. Glicoproteínas mucosas, incluindo as mucinas salivares e glicoproteínas ricas em prolina, aumentam a lubrificação para o bolo alimentar e facilitam a deglutição. Também contém enzimas, incluindo α -amilases, proteases, lipases e glico-hidrolases, que iniciam a digestão parcial de componentes alimentares (AMANO et al., 2012; RUHL, 2012).

A saliva também exerce importante ação defensiva contra danos promovidos por: ataques mecânicos, químicos e infecciosos, garantindo proteção contra numerosas bactérias orais e fungos, por meio de uma atividade antimicrobiana local exercida por enzimas, imunoglobulinas, lisozima, lactoperoxidase e histaminas (APS; MARTENS, 2005; ZALEWSKA et al., 2011).

Além disso, a saliva desempenha papel fundamental na manutenção da limpeza dos dentes através da remoção de detritos, o que pode ser reforçado pela atividade de enzimas proteolíticas e glicolíticas. Através de um sistema de tamponamento, a saliva é capaz de neutralizar substâncias ácidas. Em adição, mantém a integridade do dente, facilitando os processos de desmineralização e remineralização (HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001; RUHL, 2012).

3.3 Transportadores de glicose

A glicose é a principal fonte de energia dos organismos eucariontes, atuando no metabolismo e homeostasia celular, tendo como sua principal fonte os carboidratos da dieta (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007). A glicose também pode regular a transcrição de genes, a atividade de enzimas, a secreção de hormônios e a atividade de neurônios glicorregulatórios (THORENS; MUECKLER, 2010).

Para a glicose ser captada do meio extracelular para o interior da célula é necessário a inserção de proteínas carreadoras para ela atravessar a bicamada lipídica das células. Essas proteínas, chamadas de transportadores de glicose, podem ser divididas em duas famílias: transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e cotransportadores de Na⁺/glicose (SGLTs) (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007; THORENS; MUECKLER 2010). A família dos GLUTs é constituída por 14 membros, enquanto a família dos SGLTs é composta por 6 membros, sendo os mais importantes SGLT1 e SGLT2 (SABINO-SILVA et al., 2010b).

Os GLUTs são responsáveis pelo transporte passivo da glicose através das membranas, pois esta família de proteínas pode realizar fluxo bidirecional de glicose de acordo com o gradiente de concentração do substrato. Devido à utilização da glicose no metabolismo celular, as forças de gradiente garantem um influxo do substrato na maioria dos tipos celulares (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007; TOYONO et al., 2011).

O GLUT2 é uma proteína codificada pelo gene *Slc2a* da família dos GLUTs, sendo capaz de processar altas concentrações de glicose de forma eficiente. O GLUT2 é um transportador relativamente abundante em todo o organismo, e sua capacidade de transporte não está limitada às condições fisiológicas. Assim, a sua contribuição em algumas patologias tem bastante relevância (LETURQUE; BROT-LAROCHE; GALL, 2009).

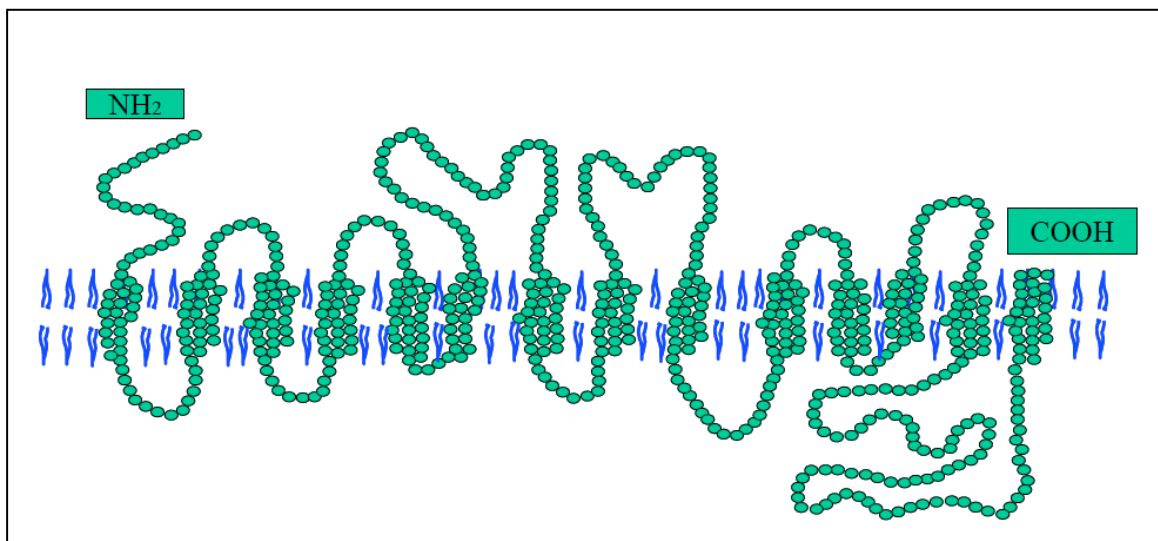
Estudos mostram que após uma alimentação rica em carboidratos, ocorre uma modulação com aumento da expressão dos níveis de GLUT2 no intestino, rim, fígado e pâncreas, sugerindo sua ação no controle de glicemia e hiperinsulinemia (MIYAMOTO et al., 1993; THORENS, 1996).

Este transportador já foi descrito na membrana basolateral do intestino, pâncreas, rim e fígado (BELL et al., 1990; THORENS et al., 1988; THORENS et al., 1990). Foi demonstrado em glândulas salivares (células acinosas da glândula parótida) a presença dos transportadores de glicose GLUT1, GLUT4 (JURYSTA et al., 2012) e mais recentemente o mRNA de GLUT2 (JURYSTA et al., 2013).

Na última década, foi bem caracterizada a presença de proteínas com papel de transporte de água em glândulas salivares. Uma delas, a proteína cotransportadora de Na^+ /glicose/água tipo 1 (SGLT1), que é codificada pelo gene *SLC5A1* e tem seu transporte acoplado de 264 moléculas de água associadas à 2 íons Na^+ e uma molécula de glicose, bem caracterizado (ZEUTHEN, 2000; WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2011). O cotransporte de SGLT1 é referido como transporte ativo secundário, porque a força motriz gerada pelo gradiente de sódio é mantida pela ativação primária da bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ na membrana basolateral (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO, 2007). A estrutura do SGLT1 e a posição de seus aminoácidos pode ser observada, na Figura 3.

A direção e a taxa de transporte de glicose por SGLT1, ocorrem em função da direção e magnitude dos gradientes de Na^+ através da membrana plasmática (WRIGHT; HIRAYAMA; LOO 2007).

FIGURA 3 - Estrutura secundária da proteína SGLT1.



O SGLT1 é composto por 14 segmentos transmembrânicos com a face N-terminal voltada ao interstício e a face C-terminal dentro da membrana plasmática. Modelo modificado de Wright e Turk, 2004.

Entre as substâncias com capacidade de inibir o transporte de glicose está a florizina, que é um glicosídeo derivado de plantas e atua especificamente como inibidor por competição dos SGLTs (BAKRIS et al., 2009). Os estudos sobre o mecanismo de inibição do transporte intestinal de glicose na membrana pela florizina, demonstraram que este transporte é saturável e eletrogênico (DEBNAM; LEVIN, 1975; EHRENKRANZ, et al., 2005). Também foi demonstrado que este transporte de glicose, que pode ser inibido pela florizina, contribui para a absorção de água (FULLERTON; PARSONS, 1956). No território renal, a florizina suprime

a reabsorção tubular de glicose por meio do bloqueio dos SGLTs, aumenta a excreção urinária de glicose e reduz os níveis de glicose no plasma de ratos diabéticos hipoinsulinêmicos (ROSSETTI et al., 1987). A isoforma SGLT2, codificada pelo gene SLC5A2 predominantemente no tecido renal, transporta apenas um íon Na^+ para cada molécula de glicose (ZHAO; KEATING, 2007). Pelo nosso conhecimento, a isoforma SGLT2 não foi descrita em glândulas salivares.

Em células transfectadas com SGLT1, demonstrou-se claramente que a ativação da via AMPc-PKA aumenta a taxa do cotransporte de Na^+ /glicose, e isto foi relacionado com o aumento do teor de proteína SGLT1 na membrana plasmática (HIRSCH; LOO; WRIGHT, 1996). Isto sugere que a atividade β -adrenérgica, por meio da via da AMPc-PKA, também é capaz de modular a captação de glicose mediada por SGLT1 nas células acinosas das glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2010a).

Sabe-se que o SGLT1 está presente em membrana basolateral de células acinosas (TARPEY et al., 1995), na célula miopitelial (SABINO-SILVA et al., 2009) e na membrana apical de ductos intercalares (SABINO-SILVA et al., 2009) de glândulas salivares. No entanto, o papel da SGLT1 na modulação do fluxo de água em glândulas salivares sob condições fisiológicas ainda não foi claramente definido.

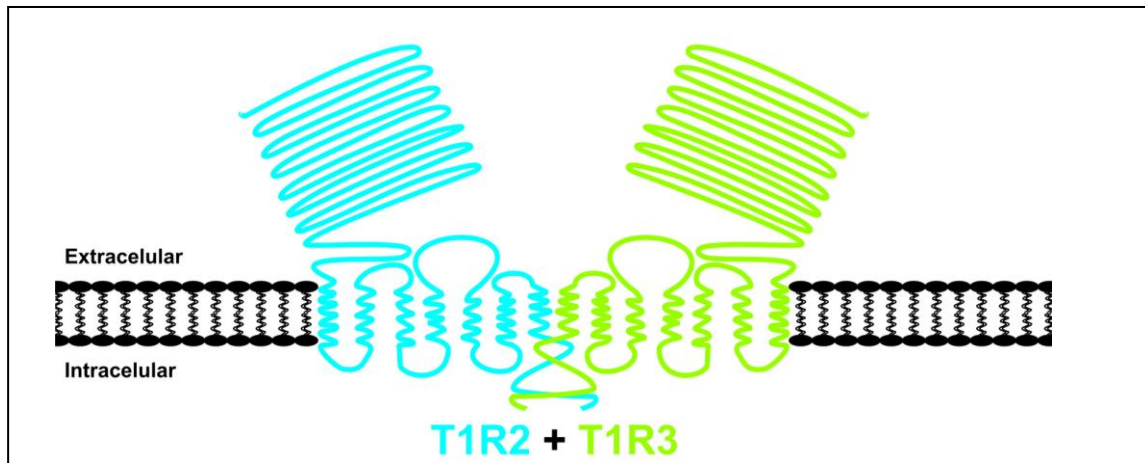
3.4 Sensores de glicose

Os sensores de glicose são proteínas com alta especificidade na detecção de glicose. Eles constituem uma família de receptores de sabor doce, os T1R (tradução livre para “*sweet taste receptors*”) que são formados por um grupo de 3 receptores acoplados à proteína G (GPCRs). São eles: T1R1, T1R2 e T1R3. Cada uma destas proteínas é codificada pelos seus respectivos genes: *Tas1r1*, *Tas1r2* e *Tas1r3* (BACHMANOV et al., 2001; NELSON et al., 2001; SAINZ et al., 2001). Os T1R3 são membros da família de subtipo 3 de GPCRs, todos os quais contêm grandes domínios extracelulares (MAX et al., 2001).

Os membros da família dos T1Rs costumam atuar em conjunto, na forma de heterodímeros. Baseado em estudos eletrofisiológicos e de biologia molecular foi constatado que a combinação heteromérica de T1R1 + T1R3 atua como sensores de aminoácidos e gosto umami, enquanto as associações de T1R2 + T1R3 atuam como sensor de açúcares, glicoproteínas e adoçantes artificiais (LI et al., 2002). Outra observação importante sobre o heterodímero T1R2 + T1R3 é a diversidade estrutural dos seus ligantes. Este receptor reconhece vários tipos de açúcares incluindo carboidratos, aminoácidos, proteínas e açúcares

artificiais (XU et al., 2004). A interação entre o heterodímero T1R2 + T1R3 é representada na Figura 4.

FIGURA 4 - Representação esquemática dos receptores de sabor doce T1R2 e T1R3.



Os receptores da família dos T1Rs atuam como complexos heteroméricos. Modelo adaptado de Chandrashekar et al., 2006.

Atualmente, sabe-se que os sensores de sabor podem detectar vários tipos de gosto como: doce, amargo, salgado, azedo e umami. Classicamente os sensores de sabor foram descritos no epitélio lingual (MCLAUGHLIN; MCKINNON; MARGOLSKEE, 1992). Estudos de biologia molecular demonstraram que existem células especializadas em detecção de sabor em outros territórios como ductos pancreáticos (HOFER; DRENCKHAHN, 1998), intestino (DYER et al., 2005) e cérebro (REN et al. 2009).

Os T1Rs são GPCRs que agem acoplados a transducina (α -gustducin), através do qual podem ativar uma fosfolipase C (PLC) via β 2-dependente para aumentar concentração intracelular de Ca^{++} . Estes receptores também podem ativar uma via dependente de AMPc. (MARGOLSKEE, 2002). Em enterócitos, foi proposto que na presença de açúcares, glicoproteínas ou adoçantes artificiais o sensor de açúcar acoplado em GPCR voltado para o lúmen, ativa a via da Adenilatociclase-AMPcíclico-PKA, o que promove aumento da translocação do SGLT1 para membrana luminal desta célula (DYER et al., 2003; MARGOLSKEE et al., 2007).

3.5 Diabetes Mellitus

O Diabetes é uma das doenças crônicas mais prevalentes na atualidade e atinge proporções epidêmicas em todo o mundo, constituindo um grande problema de Saúde

Pública. Em 2013, cerca de 383 milhões de pessoas no mundo, eram diabéticas e espera-se que no ano de 2035 cerca de 592 milhões de pessoas estejam acometidas por esta doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013). O Diabetes apresenta um grande impacto social, pois pode acometer indivíduos durante a juventude, e a prolongada exposição à hiperglicemia antecipa o desenvolvimento das complicações crônicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006; NOVATO; GROSSI, 2011).

O Diabetes mellitus é uma síndrome de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia inapropriada, resultante de defeitos na secreção e/ou ação de insulina. Os sintomas clássicos são: poliúria, polidipsia, polifagia e visão turva (MASHARANI; KARAM, 1997; GROSS et al., 2002; SICREE et al., 2003). A hiperglicemia cronicamente resulta em anormalidades microcirculatórias, nefropatias, retinopatias e neuropatias periféricas. Podem ocorrer distúrbios no processo de cicatrização e também o surgimento de complicações agudas que podem levar a risco de vida: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica (GREGORI et al., 1999; SOUSA et al., 2003).

A manutenção do equilíbrio de glicose no nosso corpo depende principalmente da estimulação de insulina para a captação de glicose pelas células musculares e adiposas, provocada principalmente por um aumento nos níveis de transportadores de glicose GLUT4, na membrana plasmática (OKAMOTO et al., 2011).

As investigações sobre a concentração de glicose salivar exploram a possibilidade do monitoramento do diabetes ser realizado por um método não-invasivo. Mesmo com o aumento da concentração de glicose salivar identificado em diabéticos, sabe-se que a glicemia plasmática apresenta fraca correlação com a concentração de glicose salivar, exceto em situações com glicemia plasmática acima de 15 mM (REUTERVING, 1986), fato que tem impedido o uso da saliva como fluido diagnóstico para o monitoramento da glicemia.

Independente do grau de deficiência de insulina no diabetes, um controle rigoroso dos níveis de glicose no sangue, tem sido proposto para prevenir complicações e melhorar a expectativa de vida (PURNELL et al., 1998; DCCT, 2001; OKAMOTO et al., 2011). Entretanto, os testes atuais para medida glicêmica causam dor, calos e diminuem a circulação sanguínea nos dedos (local frequente da retirada do sangue), o que prejudica substancialmente a qualidade de vida desses pacientes. Devido à esses inconvenientes, a média de avaliações glicêmicas é de duas vezes por dia, o que é abaixo dos 4-7 monitoramentos recomendados (DAVIDSON, 1991). O estabelecimento de um método de monitoramento glicêmico não-invasivo, indolor e rápido por meio da saliva reduziria muito as complicações e os custos do tratamento para esses milhões de pacientes.

3.6 Regulação dos GLUTS e SGLTs em glândulas salivares e sua relação com Diabetes Mellitus

Os diabéticos apresentam redução do fluxo salivar (CONNER et al., 1970) e alterações na composição da saliva como aumento da concentração de glicose (CAMPBELL, 1965; REUTERVING, 1986) e diminuição da concentração de proteínas (ANDERSON et al., 1993). Em glândulas salivares, o diabetes causa uma ampla degeneração celular com substituição de células do parênquima por tecido conjuntivo fibroso (REUTERVING, 1986; ANDERSON, SULEIMAN; GARRETT, 1994).

Foi descrito que a concentração de glicose na saliva primária é estreitamente relacionada com a concentração de glicose no plasma, no entanto, a concentração de glicose na saliva final de diabéticos, não foi significativamente correlacionada com a sua hiperglicemia (SHARON et al., 1985; MANGOS; MARAGOS; MCSHERRY, 1973). Sabino-Silva e colaboradores (2013) propõem que em ratos diabéticos, quando a glicemia aumenta, a concentração de glicose na saliva primária também aumenta, e apesar de um aumento da reabsorção ductal, a concentração de glicose na saliva final permanecerá elevada.

O aumento da concentração de glicose salivar nos diabéticos também provoca diversas alterações na cavidade oral do paciente, como o aumento da incidência e severidade das cáries (REUTERVING, HÄGG; GUSTAFSON, 1986; LIN et al., 1999), da prevalência de candidíase oral (REUTERVING et al., 1986) e doenças periodontais (MEALEY; OATES, 2006).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou que ativação de fibras ganglionares simpáticas que se dirigem para as glândulas salivares, promovem o aumento da PKA neste território. Adicionalmente, demonstramos que o diabetes mellitus promove a diminuição da atividade simpática para as glândulas salivares, o que foi correlacionado diretamente com a expressão da PKA. Em células acinosas ocorreu correlação da expressão da PKA com a expressão da SGLT1 em membrana basolateral (SABINO-SILVA et al., 2010a). Adicionalmente, foi demonstrado em animais diabéticos que a proteína SGLT1 está aumentada na membrana luminal de células ductais de glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2009), porém este aumento não se correlaciona com a atividade simpática para estas células (SABINO-SILVA et al., 2013).

O aumento do SGLT1 na membrana luminal das células ductais de ratos diabéticos está de acordo com a taxa de fluxo salivar diminuída detectada nestes animais. Assim, a regulação inversamente proporcional do conteúdo luminal de SGLT1 e do fluxo salivar

aponta que este transportador está envolvido na fisiopatologia da xerostomia do diabético (SABINO-SILVA et al., 2013).

Recentemente foi demonstrado que a atividade simpática promove, pela ativação de receptores β -adrenérgico, a translocação do SGLT1 para a membrana luminal de células ductais, onde ele deve desempenhar um papel fundamental na reabsorção de água e consequentemente no fluxo salivar (SABINO-SILVA et al., 2013). O diabetes diminui a atividade simpática para as glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2010a) mas o conteúdo luminal do SGLT1 é aumentado em glândulas de ratos diabéticos, sugerindo a presença de um mecanismo adicional de regulação da translocação SGLT1 ainda não descrito para este território.

Entretanto, ainda não está esclarecido o mecanismo molecular que promove o aumento da expressão de SGLT1 na membrana luminal de células ductais de ratos diabéticos. Com a descrição de um sensor de glicose em células ductais de glândulas salivares de diabéticos, o aumento da concentração de glicose salivar seria capaz de aumentar a formação de PKA sem ativação simpática. Isto poderia explicar o aumento de SGLT1 somente em ductos de glândulas salivares de ratos diabéticos apesar da diminuição da atividade simpática para as glândulas salivares. Além disso, o papel funcional do SGLT1 neste território, especialmente no que se refere a sua capacidade de regular o fluxo salivar, a concentração de glicose salivar e a excreção de glicose na saliva ainda não estão claramente estabelecidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alagoas, sob protocolo de número 29/2012.

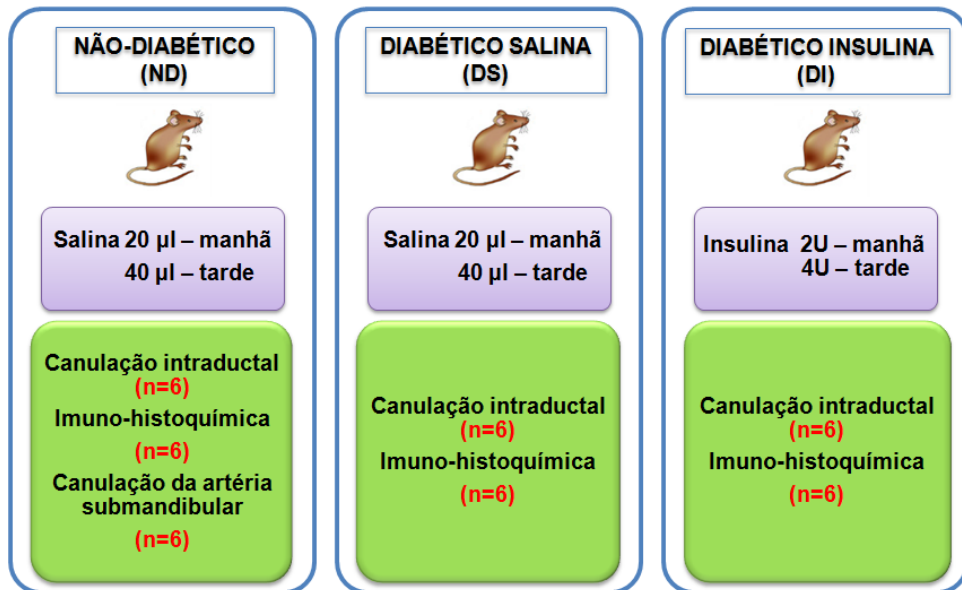
4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os animais foram acondicionados no biotério do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde nas seguintes condições: a) ciclo de 12/12 horas de claro/escuro, b) temperatura ambiente 23 ± 2 °C; e c) oferta plena de água e ração para roedores. Foram estudados os seguintes grupos de animais:

- a) **Não- diabéticos (ND):** ratos de 3 meses que receberam injeção do veículo aos 2 meses e tratamento com salina durante 7 dias;
- b) **Diabéticos tratados com insulina (DI):** ratos de 3 meses que receberam injeção de aloxana aos 2 meses e tratamento com insulina durante 7 dias;
- c) **Diabéticos tratados com salina (DS):** ratos de 3 meses que receberam injeção de aloxana aos 2 meses e tratamento com salina durante 7 dias.

Foram estudados 2 conjuntos de animais (ND, DS e DI) pra realização de 2 experimentos (Canulação intraductal e Imuno-histoquímica). Além disso, 1 outro conjunto de animais (ND) foi estudado para realização do experimento de microinfusão de veículo ou glicose na artéria submandibular (Ntotal: 42 / n:6 por grupo experimental). No primeiro conjunto de animais (ND, DS e DI) foram realizados os procedimentos de canulação intraductal para avaliação da secreção salivar *in vivo* estimulada por pilocarpina. E no outro conjunto de animais (ND, DS e DI) foi realizada a técnica de imuno-histoquímica sem a presença de estímulo parassimpático. Por fim, no terceiro conjunto, com apenas um grupo experimental (ND), foram realizados os procedimentos de canulação das artérias submandibulares direita e esquerda, para avaliar a translocação de SGLT1 sob estímulo agudo da glicose ou veículo. Os grupos experimentais do estudo podem ser vistos na Figura 5.

FIGURA 5- Grupos experimentais estudados

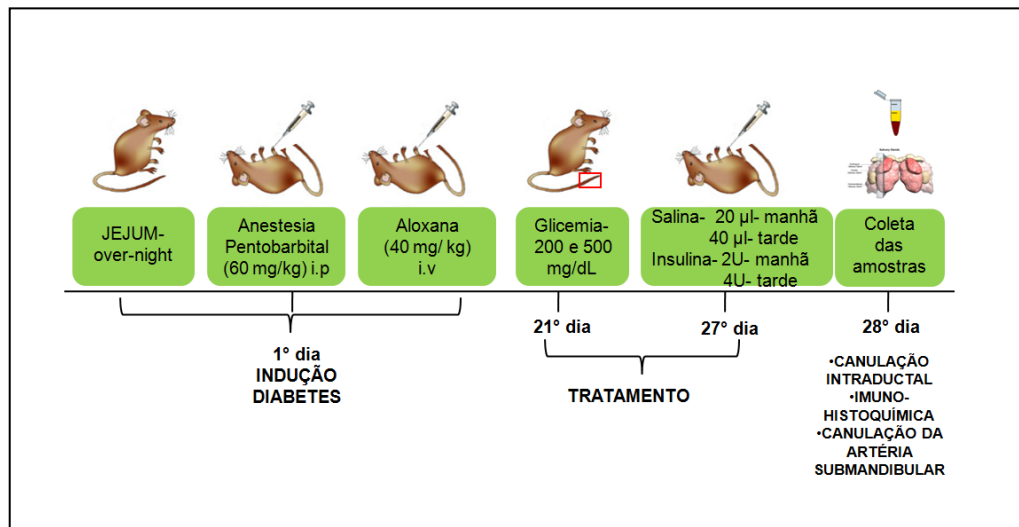


Fonte: Autor, 2014.

4.2 Modelo experimental

Os animais permaneceram sob jejum prévio de 12 horas. Após esse período, o diabetes foi induzido por aloxana, que é uma tetraoxipirimidina capaz de promover necrose específica da célula β da ilhota pancreática. A Aloxana foi diluída em solução salina e a solução foi administrada na dose de 40 mg/kg de peso corpóreo por via intravenosa (veia peniana) sob anestesia induzida por pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), em animais com 2 meses de idade.

Entre os animais que receberam aloxana foram selecionados, após 21 dias, somente aqueles que apresentaram glicemia entre 200 e 500 mg/dL. Estes foram aleatoriamente divididos em grupo de ratos DS ou DI. Após 21 dias da indução do diabetes, os ratos foram tratados durante 7 dias com salina (DS) ou insulina (DI) por via intraperitoneal (i.p.). A dose de insulina NPH (Biohulin, Biobras, Brasil) foi de 6U diárias às 8:00 e 17:00 horas (2U/manhã e 4U/tarde; SABINO-SILVA et al., 2009). O modelo experimental do estudo está ilustrado na Figura 6.

FIGURA 6 - Modelo experimental do estudo.

Fonte: Autor, 2014.

4.3 Peso corporal

O peso corporal dos ratos não-diabéticos (ND), diabéticos tratados com salina (DS) e diabéticos tratados com insulina (DI) foram verificados no dia da injeção (i.v) de salina ou aloxana (1º dia) e após a injeção (21º e 28º dias).

Os valores de peso corpóreo foram adquiridos no final do tratamento (28º dia). Os valores de variação do peso ponderal correspondem à diferença de peso entre o fim (28º dia) e o início do tratamento (21º dia).

4.4 Coleta das amostras

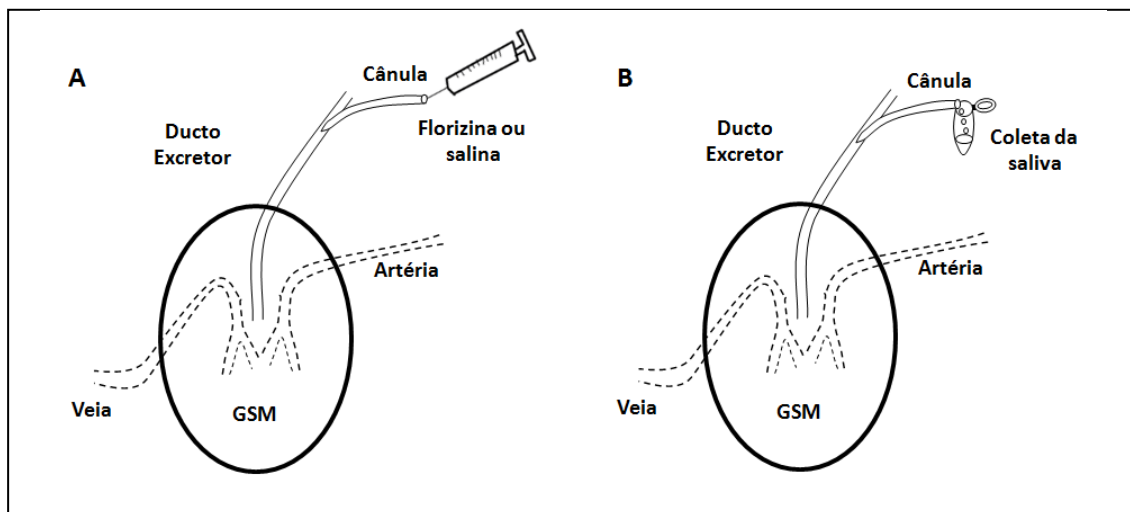
4.4.1 Coleta das glândulas salivares

Um conjunto de ratos não-diabéticos, diabéticos e diabéticos tratados com insulina foi anestesiado com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) e, após a abolição dos reflexos corneanos e de retirada da pata à dor, foram coletadas todas as glândulas salivares. Em seguida, as glândulas foram pesadas separadamente (peso úmido) e as glândulas submandibulares foram processadas para a realização dos procedimentos de imunofluorescência.

4.4.2 Coleta de saliva associada à microinfusão de florizina ou salina no ducto glandular

Outro conjunto de animais (NS, DS e DI) foi anestesiado com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) e posicionado em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica mantida em 37° C. Em seguida, foi realizado um acesso cirúrgico na região cervical do animal com auxílio de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos, modelo MC-M1232), onde o ventre anterior do músculo digástrico foi dissecado para visualização do ducto da glândula submandibular que foi cuidadosamente divulsionado das estruturas adjacentes. Posteriormente, uma cânula (PE-10 Tygon) foi implantada dentro do ducto da glândula submandibular direita. Para a microinfusão intraductal, esta cânula foi interligada a uma cânula de maior calibre (PE-50 Tygon) que encontrava-se conectada a uma seringa, deste modo, foram injetados soluções de 30 µl florizina (10⁻³ M, Sigma, ND-Florizina ou DS-Florizina) ou salina fisiológica (ND-Sal ou DS-Sal) durante três minutos. Em seguida, foi realizada a estimulação da secreção salivar através do estímulo de um agonista muscarínico: pilocarpina (4 mg/Kg, i.p.) (ROESINK et al.,1999). Após o início de sua secreção, a saliva foi coletada através da mesma cânula intraductal durante 10 minutos. O volume de saliva foi calculado considerando a diferença de peso de “ependorfs” antes e após a coleta da saliva (Figura 7).

FIGURA 7 - Modelo esquemático de canulação intraductal da glândula submandibular seguido de microinfusão de florizina ou salina.

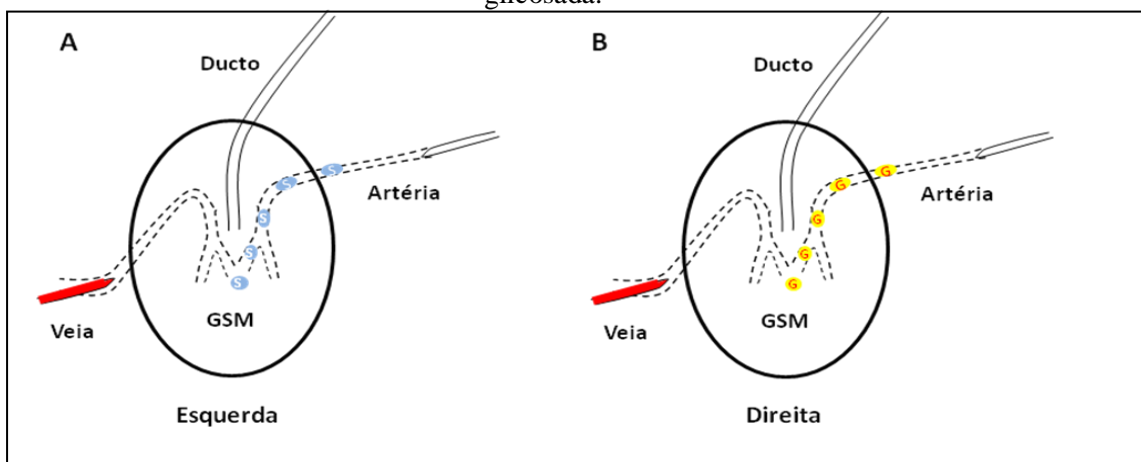


A) Inserção da cânula no ducto. B) Coleta da saliva após estímulo farmacológico com pilocarpina. .GSM: glândula submandibular. Modelo adaptado de Okubo e Kawaguchi, 2013.

4.4.3 Administração de solução glicosada (50%) através da canulação da artéria submandibular

Um outro conjunto de animais não-diabéticos foi anestesiado com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.). Em seguida, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica mantida em $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$. Posteriormente, foi realizado um acesso cirúrgico na região ventral do pescoço do animal para a exposição das glândulas submandibulares. A glândula submandibular esquerda foi dissecada e com auxílio de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos, modelo MC-M1232), a artéria e a veia submandibular foram divulsionadas e separadas das demais estruturas. Em seguida, uma cânula (PE-10 Tygon) foi implantada na artéria submandibular esquerda. Esta cânula foi interligada a outra cânula de maior calibre (PE-50 Tygon) conectada a uma seringa, assim, foram injetados 500 μl de salina fisiológica durante 5 minutos. Depois de 30 minutos, a glândula submandibular esquerda foi removida. Logo após, o mesmo procedimento foi realizado na glândula submandibular direita, na qual foram injetados 500 μl de solução glicosada (50%) (Samtec Biotecnologia) durante 5 minutos. Depois de 30 minutos, a glândula submandibular direita foi removida. Antes da administração de salina fisiológica ou de solução glicosada, a veia submandibular foi imediatamente cortada, servindo como local de saída da solução injetada, impedindo que a mesma atingisse a circulação sistêmica. Deste modo, a glândula submandibular esquerda foi considerada controle autógeno da direita. A figura 8 demonstra o modelo esquemático deste procedimento.

FIGURA 8 - Modelo esquemático de canulação da artéria submandibular com injeção de solução glicosada.



(A) Injeção de Salina na glândula submandibular (GSMe) esquerda (B) Injeção de solução glicosada 50% na glândula submandibular (GSMd) direita.

Fonte: Autor, 2014.

4.4.4 Coleta do sangue

O sangue foi coletado através da veia cava inferior para análise das concentrações plasmáticas de glicose.

4.5 Avaliação das concentrações de glicose plasmática e salivar

A concentração de glicose plasmática foi determinada durante as cirurgias, com o auxílio de um glicosímetro (Accu-chek Advantage; Roche Diagnostics, Indiana, EUA) e em seguida, confirmada por meio de método enzimático colorimétrico (Glicose PAP Liqform, Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brasil).

As concentrações de glicose salivar foram determinadas em amostras de saliva que foram descongeladas e homogeneizadas por inversão. Em seguida, foram colocados 10 µl de amostra em 1000 µl de reagente enzimático (Glicose PAP Liqform, Labtest Diagnóstica SA, Minas Gerais, Brasil). A solução padrão foi preparada com 1000 µl de reagente enzimático e 10 µl de solução padrão. A solução branca foi composta apenas pelo reagente enzimático, sendo esta utilizada para acertar o zero do espectrofotômetro. As amostras foram incubadas em banho-maria 37° por 10 min e em seguida analisadas no espectrofotômetro. A absorbância para leitura das amostras determinada pelo kit foi de 505 nm. Os resultados de absorbância foram convertidos em concentração de glicose (mg/dL) através do cálculo: Absorbância do teste/ Absorbância do padrão x 100.

4.6 Análise histológica das glândulas submandibulares após microinjeção de glicose ou salina na artéria glandular

Após serem coletadas, as glândulas submandibulares foram fixadas em formalina tamponada a 10% durante 4 horas, passando por sucessivas lavagens com álcool 70% até o dia de serem processadas. Posteriormente, essas glândulas foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina. Em seguida, o material parafinado foi levado ao micrótomo (Leica RM2125) para a realização de cortes de 5 µm. Esses cortes foram inseridos em lâminas histológicas. Em seguida, foram desparafinados por xilol, reidratados por concentrações decrescentes de etanol e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina. As lâminas

histológicas foram montadas, analisadas e fotografadas através de um microscópio óptico de luz convencional (Olympus BX41).

4.7 Imunofluorescência

Para verificar a localização subcelular das proteínas T1R2, T1R3, SGLT1 e GLUT2 em glândulas submandibulares, estas foram removidas e fixadas em formaldeído 4% em tampão fosfato (PBS) 0,1M, por 24 horas. Após a fixação, as glândulas foram crioprotetidas em concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30%) por no mínimo 24 horas e em seguida, incluídas em “OCT compound” (Sakura Finetechnical Co, Tokyo). Posteriormente, as glândulas foram seccionadas (10 μ m) em criostato (Leica CM 1850) e coletadas em lâminas gelatinizadas. Após re-hidratação (30 min, TA, PBS 0,1 M) foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina à 5% diluída em PBS + Triton por 1 hora. Anticorpos, Anti-T1R2 ou Anti-T1R3, Anti- SGLT1 ou Anti-GLUT2 (1:100, Chemicon International) foram incubados durante 14 horas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M (2 vezes por 5 minutos). Logo após, os cortes foram incubados com CY5 (1:150, 1h30min, Alexa Fluor 488), lavados em PBS 0,1 M (2 vezes por 5 minutos) e feita a marcação do citoesqueleto indicando a membrana plasmática (faloidina conjugada à rodamina, 1:200, 1h30min, Molecular Probes). Os controles negativos dos experimentos consistiam na omissão dos anticorpos primários. Os cortes foram lavados com PBS 0,1 M (2 vezes por 5 minutos) e em seguida, cobertos por uma lamínula, montados com fluoropep e analisados em microscópio de fluorescência (Nikon DS RI1). Foram analisados 4 a 5 cortes histológicos de cada grupo de animais e assim, selecionado um corte representativo. As imagens obtidas foram analisadas e colocalizadas com auxílio do programa computacional Picasa versão 3.

4.8 Análise dos Resultados

Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Estes foram comparados através de análise de variância (ANOVA) de uma via para dados independentes, utilizando-se o pós-teste Student-Newman-Keuls. Para análise comparativa entre dois dados utilizamos o teste T de Student. Para avaliar a correlação entre dois dados utilizamos o teste de correlação de Pearson. O nível de significância estabelecido foi de 5% (valor descritivo de $P < 0,05$). Essas análises foram realizadas com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism[®], v. 5,02 (GraphPad, USA).

5 RESULTADOS

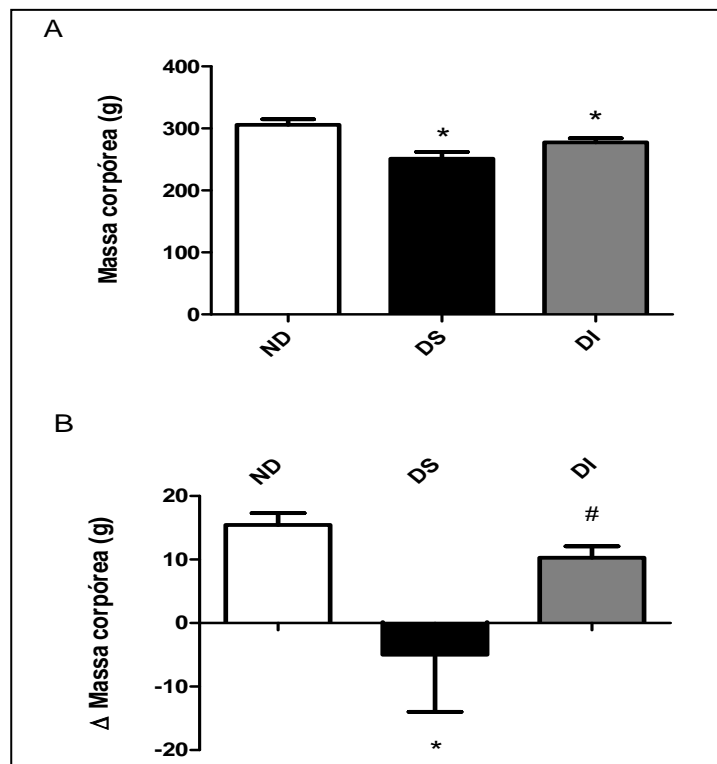
5.1 Parâmetros Gerais de Caracterização do Diabetes

5.1.1 Peso corpóreo

Os resultados do peso corporal dos ratos não-diabéticos (ND), diabéticos tratados com salina (DS) e diabéticos tratados com insulina (DI) podem ser verificados na Figura 9. A análise do peso dos ratos mostrou diminuição de 18% e 9% ($P < 0,05$) deste parâmetro em ratos DS e DI quando comparados com o grupo ND, respectivamente. Não ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$) entre os ratos DS e DI (Figura 9, A).

Em relação à variação de peso ponderal avaliado entre o 21º e 28º dia, os ratos DS tiveram diminuição ($P < 0,05$) do peso ponderal quando comparados com ratos ND. Por outro lado, o tratamento com insulina em ratos DI aumentou ($P < 0,05$) o peso ponderal quando comparado com ratos DS (Figura 9, B).

FIGURA 9 - Peso corpóreo (A) e Variação de peso ponderal (B)

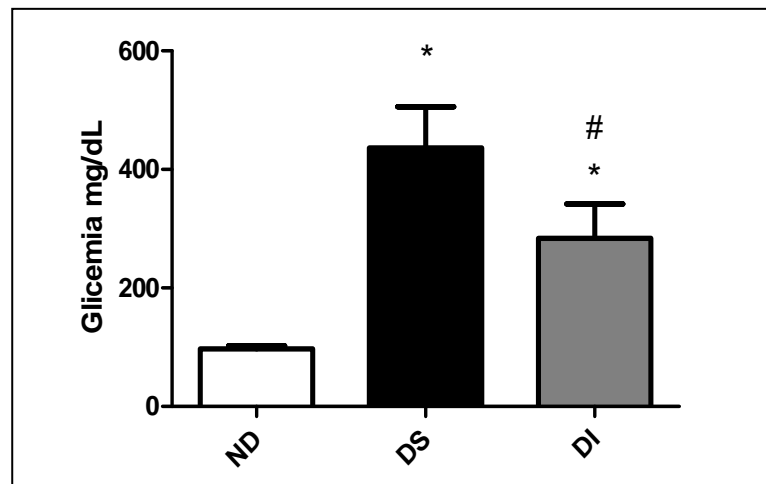


Ratos Wistar Não-Diabéticos (ND), Diabéticos Salina (DS) e Diabéticos Insulina (DI). Os valores de peso corpóreo correspondem ao peso ao final do tratamento. Os valores de variação do peso ponderal correspondem à diferença de peso entre o fim e o início do tratamento ($n=12/\text{grupo}$). Os valores são expressos em média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs ND; # $P < 0,05$ vs DS.

5.1.2 Concentração de glicose plasmática

Conforme esperado após a indução do diabetes, a concentração de glicose plasmática (Figura 10) dos ratos DS aumentou 348% ($P < 0,05$) quando comparada com os ratos ND. Também foi verificada que a glicemia diminuiu 35% ($P < 0,05$) nos ratos DI quando comparado com os ratos DS, o que era esperado após a insulino-terapia. O tratamento com insulina reverteu parcialmente a condição de diabetes, pois a glicemia de ratos DI mostrou-se aumentada 191% ($P < 0,05$) comparada com ND.

FIGURA 10- Concentração de glicose plasmática

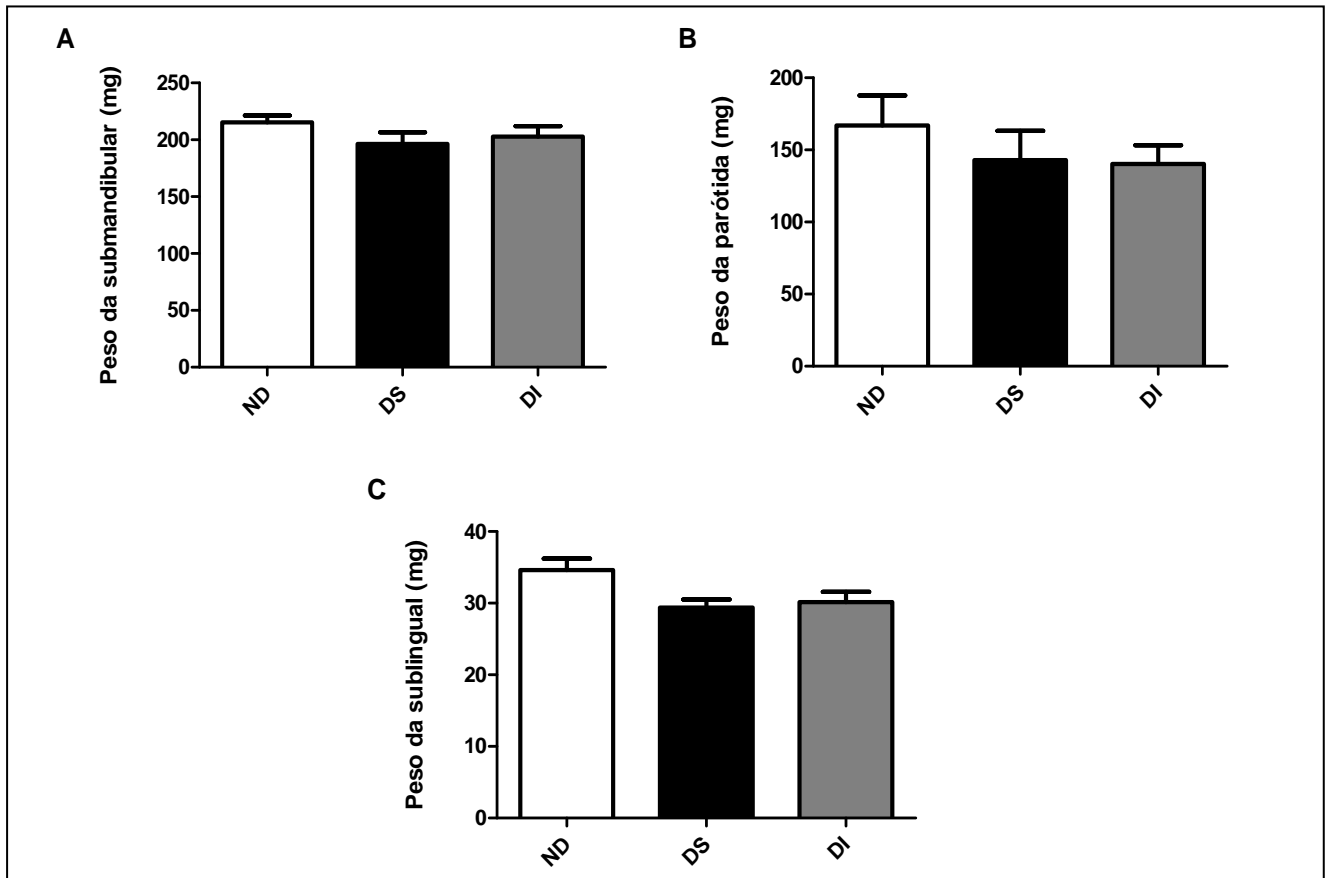


Ratos Não-Diabéticos (ND), Diabéticos Salina (DS) e Diabéticos Insulina (DI) ($n=12$ /grupo). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs ND; # $P < 0,05$ vs DS.

5.1.3 Pesos das glândulas salivares

Ao analisarmos o peso das glândulas submandibular, parótida e sublingual, verificamos que não ocorreu alteração entre os grupos ND, DS e DI (Figura 11).

FIGURA 11- Peso das Glândulas Salivares



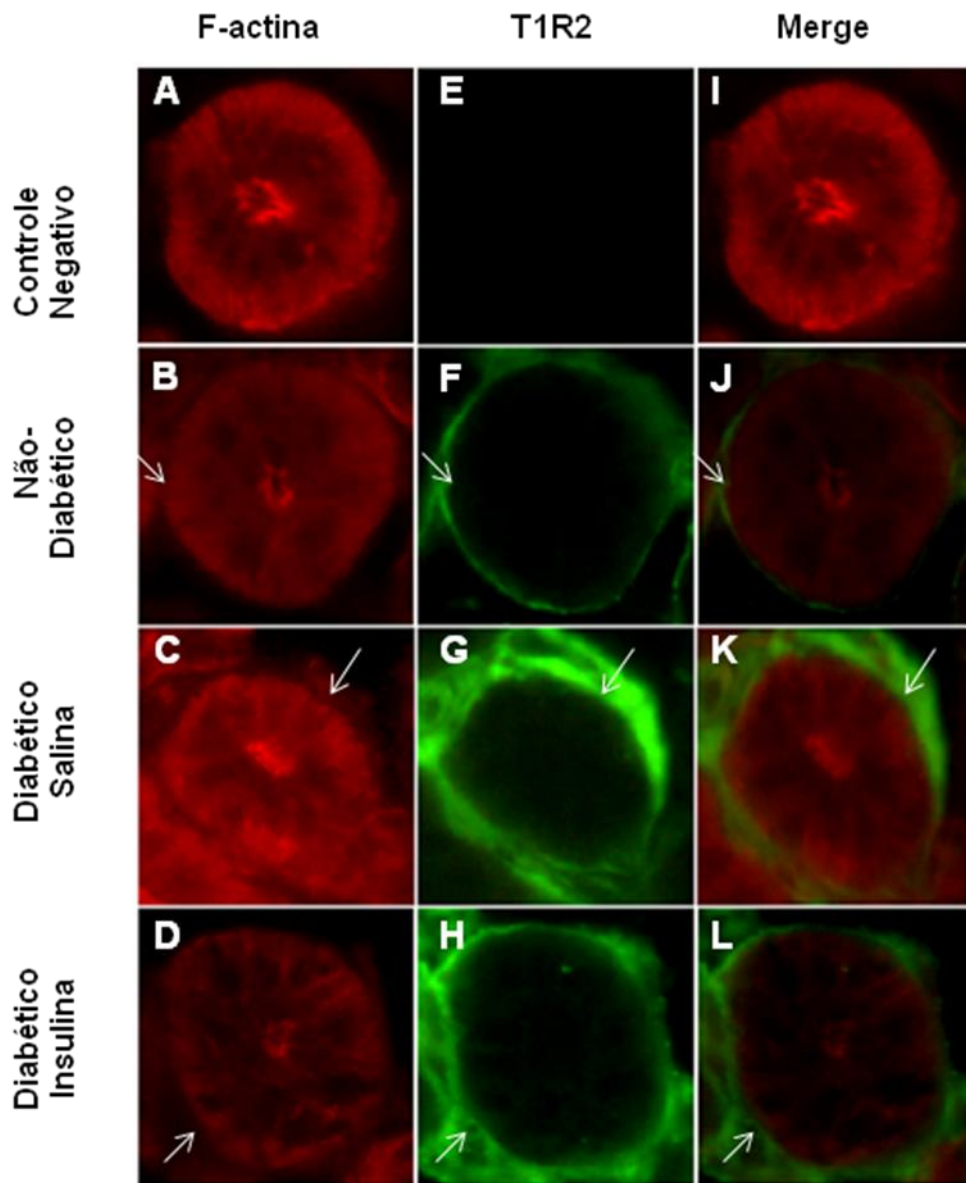
Glândulas Submandibulares (A), Parótidas (B) e Sublinguais (C) direitas de ratos Wistar Não-Diabéticos (ND), Diabéticos Salina (DS) e Diabéticos Insulina (DI) (n=12/grupo). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls.

5.2 Detecção por imunofluorescência do sensor de glicose T1R2 e T1R3 em glândula submandibular

A imunofluorescência para T1R2 demonstrou, pela primeira vez, a expressão desta proteína em glândulas salivares. A análise da imunofluorescência para T1R2 em células ductais de glândula submandibular do grupos ND, DI e DS revelou marcação desta proteína em membrana basolateral de ductos estriados em glândula submandibular (Figura 12, J-L).

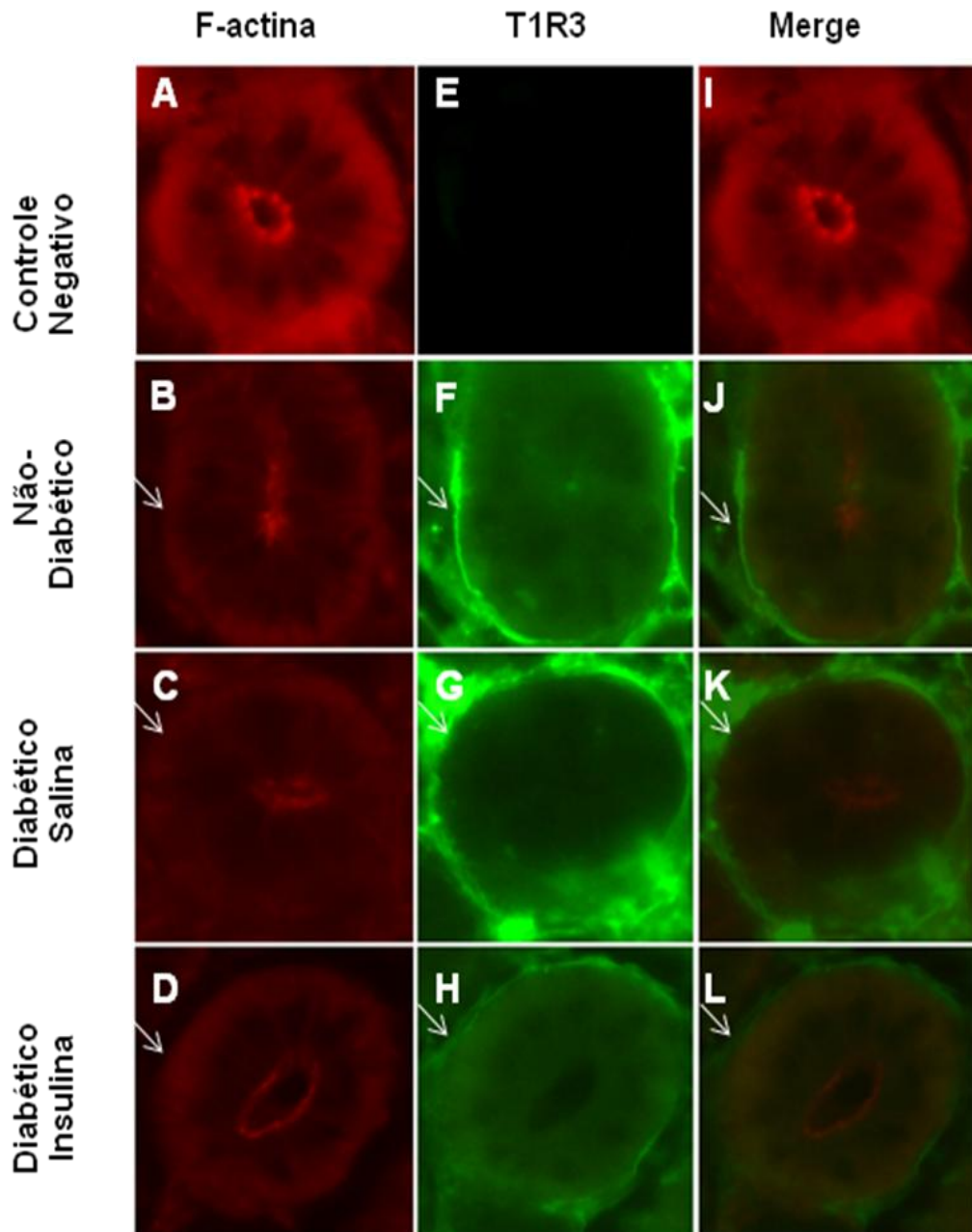
A análise da imunofluorescência para T1R3 em células ductais de glândula submandibular de ratos ND, DI e DS também revelou pela primeira vez a expressão desta proteína em glândulas salivares. A análise subcelular demonstrou marcação semelhante à T1R2, com marcação de T1R3 em membrana basolateral de células ductais da glândula submandibular. Além disso, foi observada evidente marcação no citoplasma dos ductos estriados da glândula submandibular (Figura 13, J-L).

FIGURA 12 - Localização da proteína T1R2 no ducto da glândula submandibular



Ratos Não-diabéticos (ND), Diabéticos salina (DS) e Diabéticos insulina (DI). (A-D) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (E) Controle Negativo, (F-H) marcação para T1R2 em verde e (I-L) sobreposição das mesmas fotomicrografias, para colocalização da proteína T1R2. As setas indicam a marcação do T1R2 na membrana basolateral dos ductos. Aumento 400x.

FIGURA 13- Localização da proteína T1R3 no ducto da glândula submandibular

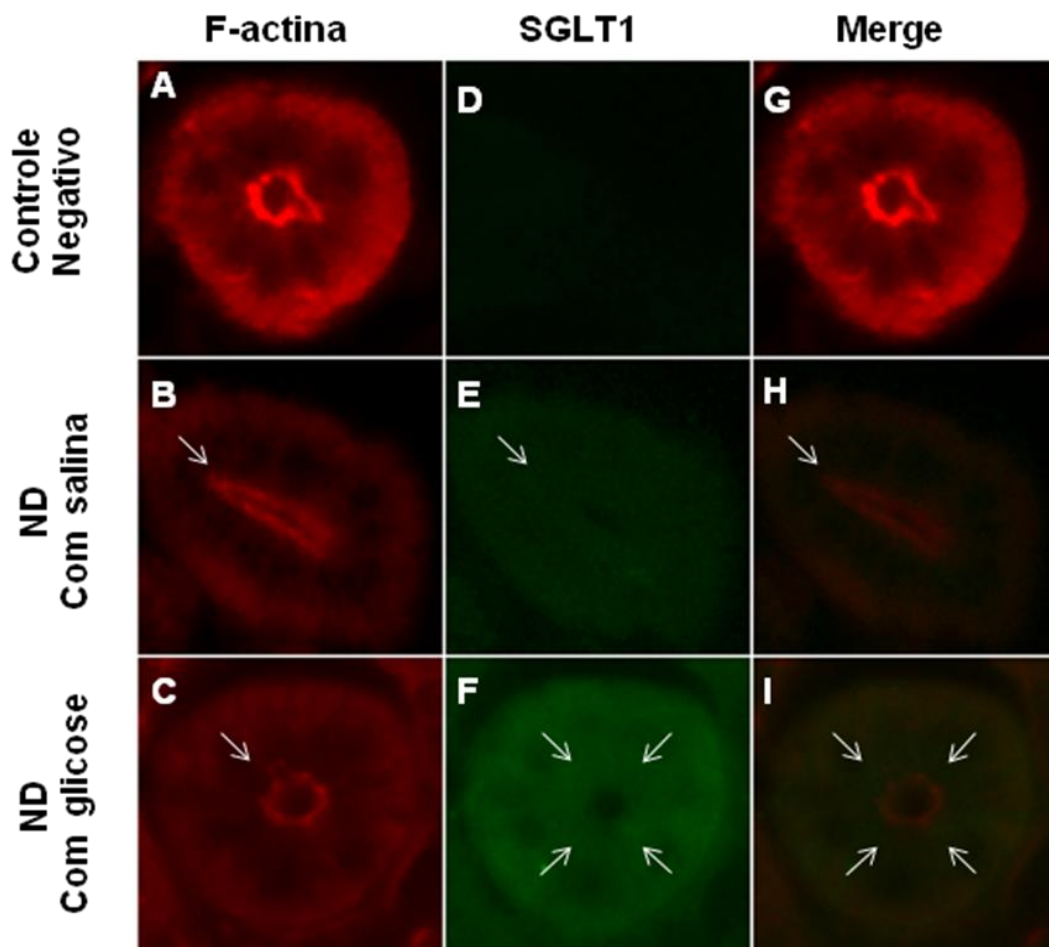


Ratos Não-diabéticos (ND), Diabéticos salina (DS) e Diabéticos insulina (DI). (A-D) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (E) Controle Negativo, (F-H) marcação para T1R3 em verde e (I-L) sobreposição das mesmas fotomicrografias, para colocalização da proteína T1R3. As setas indicam a marcação do T1R3 na membrana basolateral dos ductos. Aumento 400x.

5.3 Translocação de SGLT1 após microinjeção de glicose na artéria da glândula submandibular

Buscando identificar o papel funcional dos sensores de glicose foi realizado à imunohistoquímica do cotransportador SGLT1. A análise do SGLT1 na glândula submandibular, após microinjeção de salina na artéria da glândula submandibular, revelou marcação difusa no citoplasma e discreta marcação em membrana luminal em células ductais (Figura 14, H) Entretanto, na glândula submandibular com microinjeção de solução glicosada, esta promoveu evidente aumento na marcação do SGLT1 na região apical da célula e na membrana luminal quando comparado com salina (Figura 14, I).

FIGURA 14 - Localização do cotransportador de Sódio/glicose/água SGLT1 na glândula submandibular

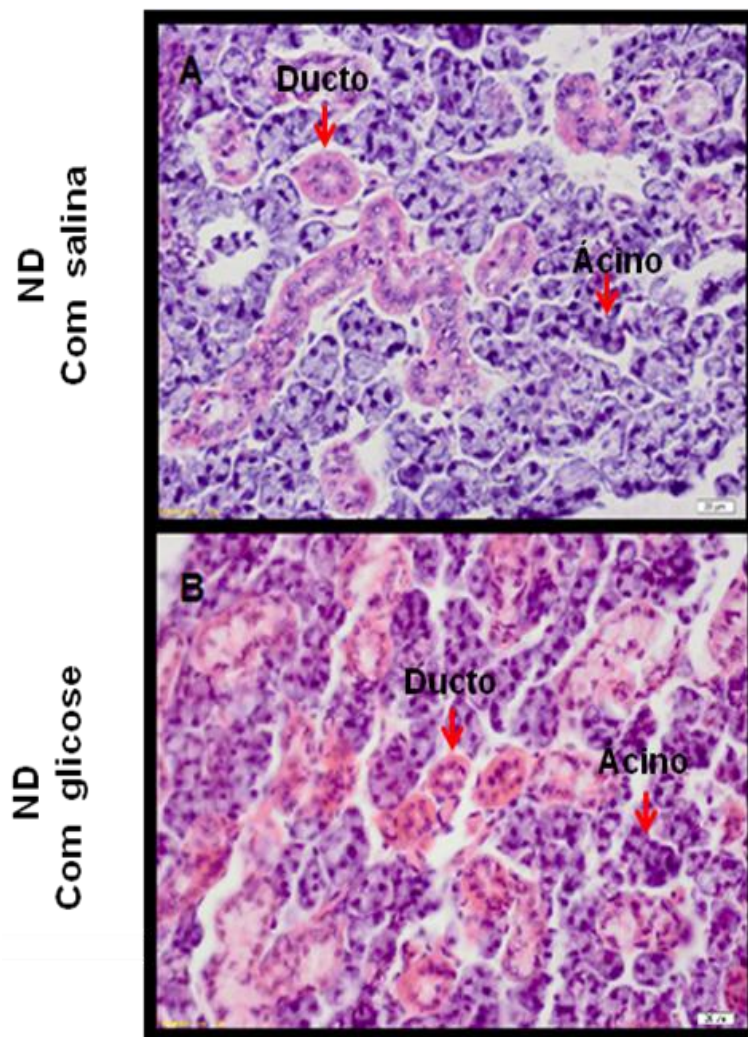


Ratos Não-diabéticos com injeção de salina (ND com salina) e Não-diabéticos com injeção de glicose (ND com glicose). (A-C) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (D) Controle negativo, (E-F) Marcação para SGLT1 em verde (H-I) sobreposição das mesmas fotomicrografias, para colocalização do SGLT1. As setas indicam o aumento da marcação do SGLT1 na membrana luminal dos ductos. Aumento 400x.

5.4 Avaliação histológica das glândulas submandibulares após microinjeção de solução com glicose ou salina na artéria glandular

Procurando detectar alguma alteração tecidual do procedimento de microinjeção de salina ou solução glicosilada foi realizada a análise histológica da glândula submandibular. Esta análise histológica da glândula submandibular após microinjeção de salina (Figura 15, A) mostra uma organização e integridade dos ácinos e ductos da glândula submandibular. Após a microinjeção de solução com glicose (Figura 15, B) foi observado um padrão da organização de ácinos e ductos semelhante à glândula que recebeu microinjeção de salina.

FIGURA 15 – Histologia da glândula submandibular após injeção de glicose ou salina na artéria glandular

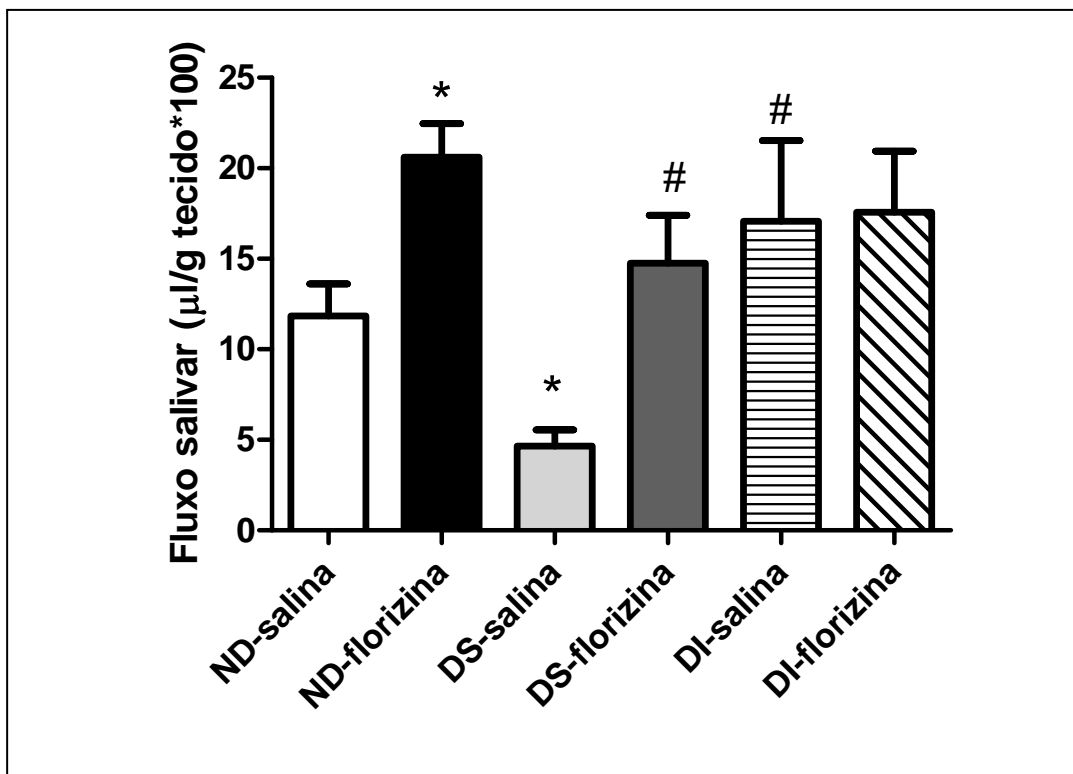


Fotomicrografia representativa dos cortes seriados da glândula submandibular após microinjeção de Salina (A) ou de solução glicosada (B), provenientes de animais não diabéticos. Aumento de 400x. Coloração Hematoxilina-Eosina.

5.5 Análise do fluxo salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular

O fluxo salivar foi analisado após injeção intraperitoneal de pilocarpina, de acordo com o peso de cada glândula, nos grupos ND-salina, ND-florizina, DS-salina, DS-florizina, DI-salina e DI-florizina (Figura 16). O fluxo salivar dos ratos ND-florizina aumentou 74% ($P < 0,05$) comparado com ND-salina. O fluxo salivar diminuiu 61% em DS-salina comparado com ND-salina. Verificamos que ocorreu um aumento ($P < 0,05$) de 216% em DS-florizina quando comparado com DS-salina. O fluxo salivar aumentou 265% ($P < 0,05$) em DI-salina comparado com DS-salina. A florizina não promoveu alterações no grupo DI-florizina comparado com o grupo DI-sal.

FIGURA 16- Fluxo salivar

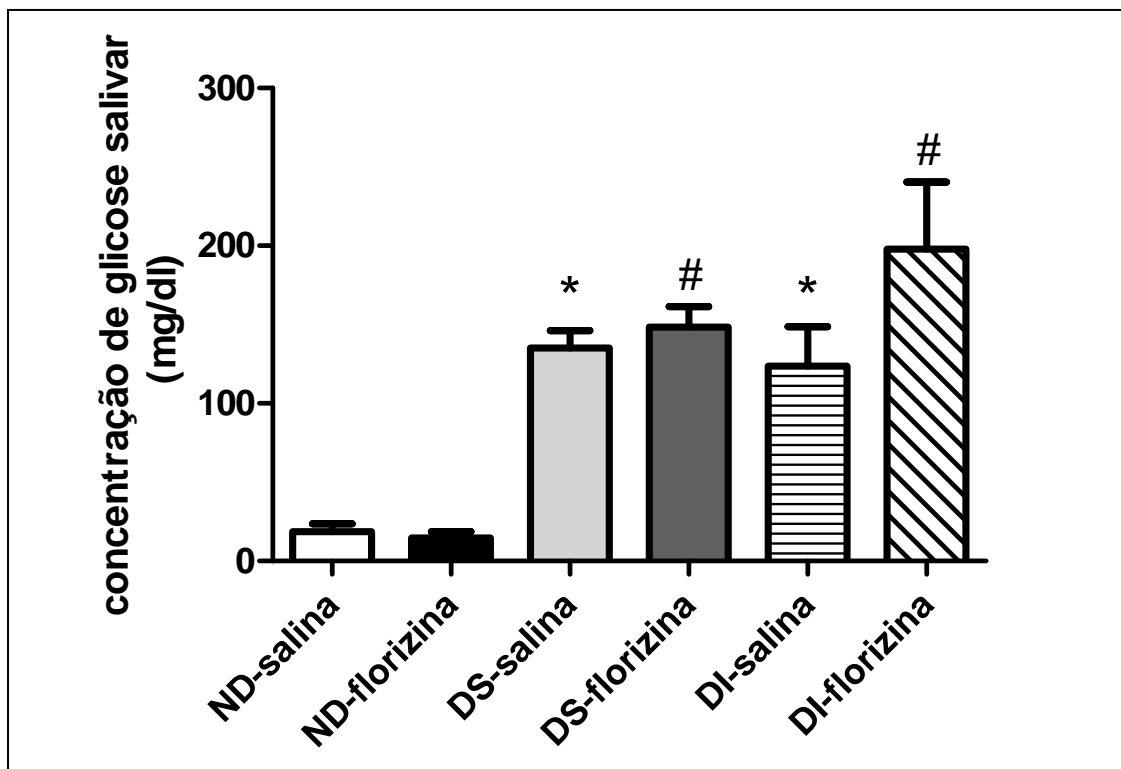


Ratos Não-Diabéticos com injeção intraductal de salina (ND-salina), Não-Diabéticos com injeção intraductal de florizina (ND-florizina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Salina (DS-salina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Florizina (DS-florizina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Salina (DI-salina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Florizina (DI-florizina). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs ND- salina; # $P < 0,05$ vs DS-salina.

5.6 Concentração de glicose salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular

A concentração de glicose salivar (Figura 17) foi aumentada 630% e 558% ($P < 0,05$) em DS-salina e DI-salina (respectivamente) quando comparados com ND-salina. De forma semelhante, ocorreu aumento de 908% e de 1252% ($P < 0,05$) da concentração de glicose salivar em DS-florizina e DI-florizina (respectivamente) quando comparados com ND-florizina. Não ocorreu diferença na concentração de glicose entre ND-salina e ND-florizina e também entre DS-salina e DS-florizina. A florizina também não alterou a concentração de glicose em DI-salina e DI-florizina.

FIGURA 17- Concentração de glicose salivar



Ratos Não-Diabéticos com injeção intraductal de salina (ND-salina), Não-Diabéticos com injeção intraductal de florizina (ND-florizina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Salina (DS-salina), Diabético tratado com salina com injeção intra-ductal de Florizina (DS-florizina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Salina (DI-salina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Florizina (DI-florizina). Valores são média \pm EPM. ANOVA One-Way, pós-teste Student Newman Keuls, * $P < 0,05$ vs ND-salina; # $P < 0,05$ vs ND-florizina.

5.7 Excreção de glicose salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular

A taxa de excreção de glicose salivar (Tabela 1) obtida entre a razão do fluxo salivar por grama de tecido e a concentração de glicose salivar foi maior ($P < 0,05$) em animais diabéticos (DS-salina) quando comparado com animais não-diabéticos (ND-salina).

Buscando avaliar a capacidade de captação de glicose pelo SGLT1, verificamos que ocorreu aumento na taxa de excreção de glicose salivar ($P < 0,05$) de 158 % em animais DS-florizina quando comparados com DS-salina e aumento ($P < 0,05$) de 64% em animais DI-florizina em comparação com DI-salina. Apesar do aumento de 27% da excreção de glicose salivar em ratos não-diabéticos com administração intraductal de florizina em comparação com a administração intraductal de salina, não ocorreu diferença significativa ($P > 0,05$).

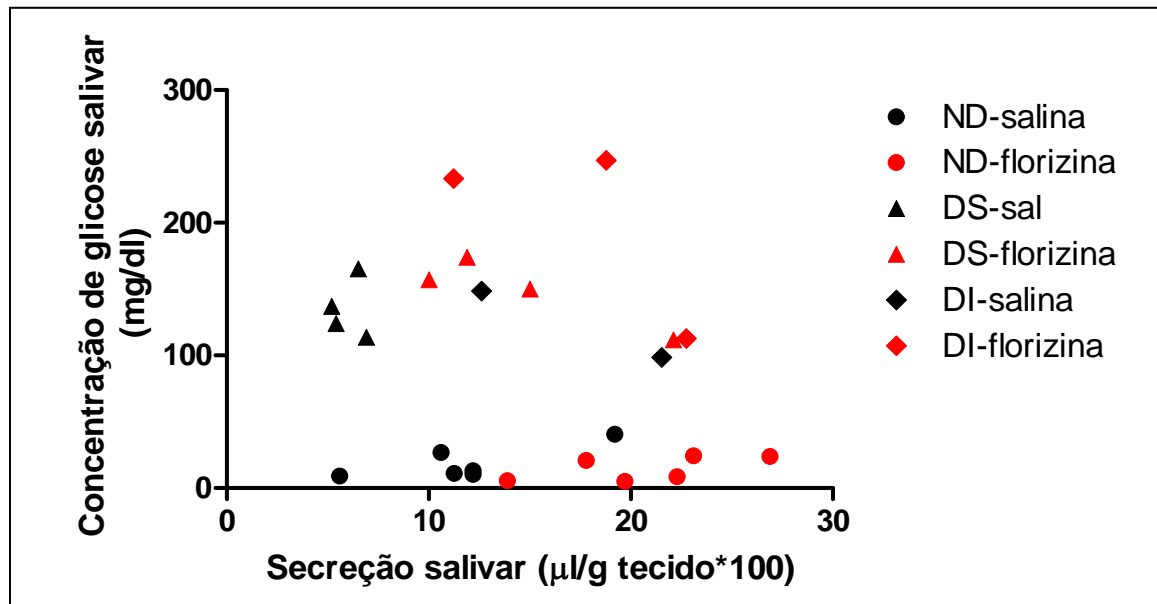
TABELA 1- Excreção de glicose salivar

	ND-salina	ND-florizina	DS-salina	DS-florizina	DI-salina	DI-florizina
Média	254	324	810 [*]	2092 [#]	1998	3275 ^f
EPM	109	98	91	192	124	682
n	6	6	4	4	2	3

Ratos Não-Diabéticos com injeção intraductal de salina (ND-salina), Não-Diabéticos com injeção intraductal de florizina (ND-florizina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Salina (DS-salina), Diabético tratado com salina com injeção intra-ductal de Florizina (DS-florizina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Salina (DI-salina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Florizina (DI-florizina). Valores são média \pm EPM. Teste T de Student. * $P < 0,05$ vs ND-salina; # $P < 0,05$ vs DS-salina; f $P < 0,05$ vs DI-salina.

5.8 Relação do fluxo salivar com a concentração de glicose após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular

A figura 18 mostra a relação entre a concentração de glicose salivar e secreção salivar. Os animais ND-salina, ND-florizina, DS-salina, DS-florizina, DI-salina e DI-florizina não apresentaram correlação de Pearson significativa ($P > 0,05$) entre a concentração de glicose salivar e a secreção salivar. Quando foi realizada uma análise destes dois parâmetros entre ratos que receberam microinjeção de salina (ND-salina, DS-salina e DI-salina, cor preta) também não ocorreu correlação de Pearson significativa ($P > 0,05$, cor preta). A análise de correlação em ratos que receberam florizina (ND-florizina, DS-florizina, DI-florizina) também não foi significativa ($P > 0,05$; cor vermelha).

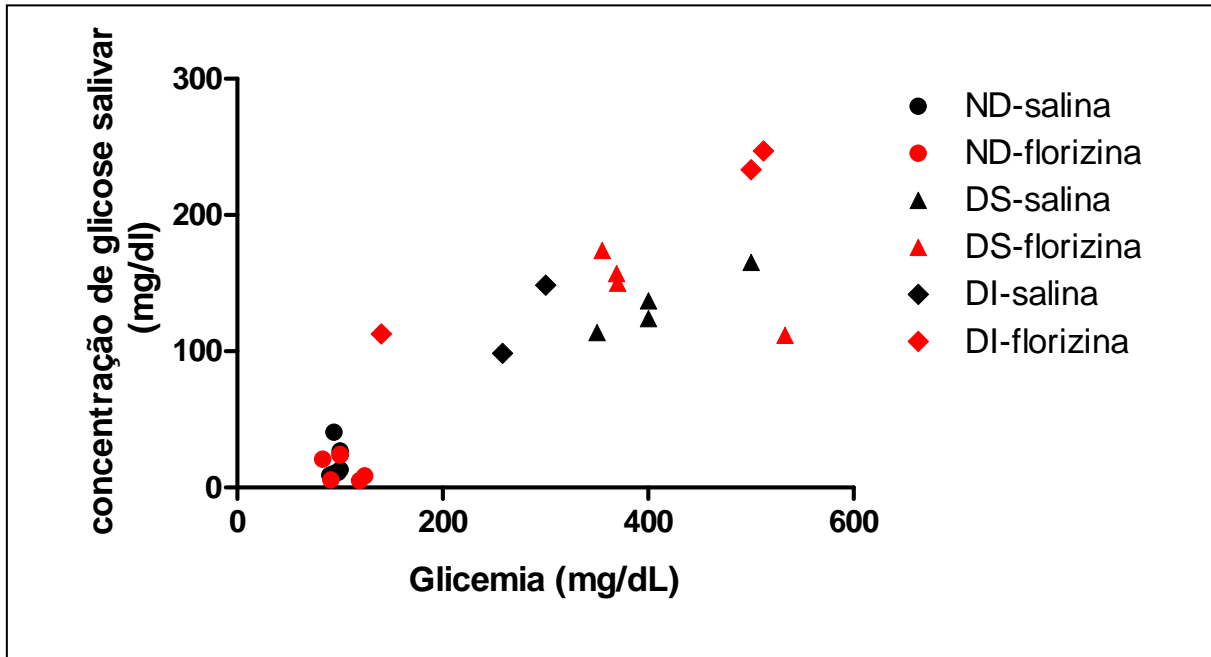
FIGURA 18- Relação do fluxo salivar com a concentração de glicose salivar

Ratos Não-Diabéticos com injeção intraductal de salina (ND-salina), Não-Diabéticos com injeção intraductal de florizina (ND-florizina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Salina (DS-salina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Florizina (DS-florizina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Salina (DI-salina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Florizina (DI-florizina).

5.9 Relação da glicemia com a concentração de glicose salivar após microinfusão de florizina ou salina no ducto da glândula submandibular

A figura 19 mostra a correlação entre a glicemia e a concentração de glicose salivar. A correlação de Pearson não foi significativa ($P > 0,05$) para ND-salina e ND-florizina. No entanto, foi significativa ($P < 0,05$) para animais DS-salina ($r^2:0,943$) e DS-florizina ($r^2:0,902$). Quando foi realizada esta análise em ratos que receberam microinjeção de salina (ND-salina, DS-salina e DI-salina, cor preta) ou florizina (ND-florizina, DS-florizina, DI-florizina, cor vermelha) ocorreu correlação de Pearson significativa ($P < 0,05$; Salina: $r^2:0,9094$; Florizina: $r^2:0,7719$).

FIGURA 19- Relação da glicemia com a concentração de glicose salivar

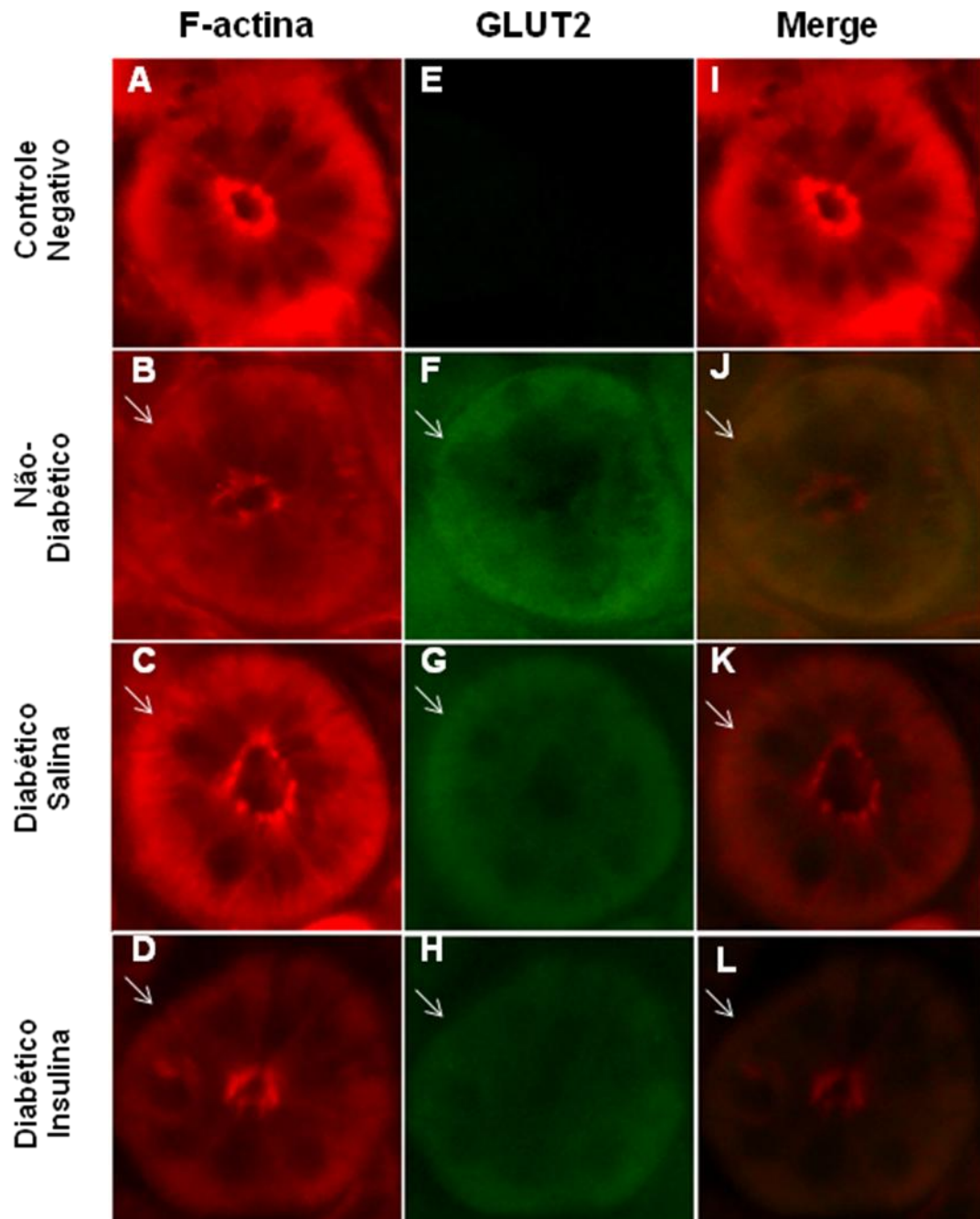


Ratos Não-Diabéticos com injeção intraductal de salina (ND-salina), Não-Diabéticos com injeção intraductal de florizina (ND-florizina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Salina (DS-salina), Diabético tratado com salina com injeção intraductal de Florizina (DS-florizina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Salina (DI-salina), Diabético tratado com insulina com injeção intraductal de Florizina (DI-florizina).

5.10 Detecção por imunofluorescência do transportador de glicose GLUT2 em glândula submandibular

A imunofluorescência para GLUT2 demonstrou, pela primeira vez, a expressão desta proteína em glândulas salivares. A análise da imunofluorescência para GLUT2 em células ductais de glândula submandibular de ratos ND, DI e DS revelou marcação desta proteína em membrana basolateral de ductos estriados em glândula submandibular (Figura 20, J-L).

FIGURA 20- Localização da proteína GLUT2 no ducto da glândula submandibular



Ratos Não-diabéticos (ND), Diabéticos salina (DS) e Diabéticos insulina (DI). (A-D) Marcação para F-actina (marcador de membrana plasmática) em vermelho, (E) Controle Negativo, (F-H) marcação para GLUT2 em verde e (I-L) sobreposição das mesmas fotomicrografias, para colocalização da proteína GLUT2. As setas indicam a marcação do GLUT2 na membrana basolateral dos ductos. Aumento 400x.

6 DISCUSSÃO

Uma série de estudos vem demonstrando que o fluxo e a composição salivar são alterados em várias doenças sistêmicas, entre elas o diabetes mellitus. Os achados do presente estudo, podem contribuir para o entendimento da expressão dos transportadores de glicose na glândula salivar, o que pode fornecer uma melhor compreensão da composição e do fluxo salivar no diabetes. Neste contexto, os principais achados desse estudo foram:

1. Os sensores de glicose T1R2 e T1R3 foram descritos pela primeira vez em glândulas salivares.
2. Após a microinjeção de glicose na artéria glandular que irriga a glândula submandibular, ocorreu aumento da translocação do SGLT1 para membrana luminal de células ductais.
3. Após a administração de florizina no ducto da glândula submandibular, promovendo a inibição do transporte de SGLT1, não ocorreu reabsorção de água neste território em ratos não diabéticos e diabéticos, aumentando assim o fluxo salivar nesses animais.
4. O transportador de glicose GLUT2 foi descrito pela primeira vez em glândula salivar.

6.1 Caracterização dos animais e de suas glândulas salivares

Os parâmetros de peso corporal e ganho ponderal dos animais controles e diabéticos, demonstraram a perda de peso nos animais, após a indução do diabetes. Em animais submetidos à insulino terapia, a recuperação do peso corporal foi observada (Figura 9). Esses resultados corroboram alguns estudos prévios (ANDERSON, 1987; FREITAS et al., 2007, SABINO-SILVA et al., 2009). O diabetes mellitus provoca danos metabólicos em vários sistemas e órgãos, incluindo a redução no peso corporal e desestruturação de diferentes tecidos, como demonstrado pela aterosclerose, retinopatias, nefropatias, distúrbios sexuais e alterações em processos de cicatrização (MAKINO et al., 1980; CALDEIRA et al., 2004). Caldeira e colaboradores (2005) comprovaram que o diabetes provoca alterações estruturais na glândula submandibular, levando a deficiências nos processos de manutenção e renovação de tecidos, além de comprometer os mecanismos funcionais.

O tratamento com insulina mostrou-se eficaz, pois além dos animais deste grupo reverterem substancialmente a perda de peso inicialmente causada pelo diabetes, após o

tratamento por 7 dias com insulina (Figura 9) eles também obtiveram uma redução substancial da glicemia (Figura 10), dados que corroboram a outros estudos (ANDERSON, 1983; HE et al., 2004, FREITAS et al., 2007). De acordo com Hu e colaboradores (1992), os níveis de glicemia devem estar abaixo de 180 mg/dL em animais não-diabéticos, enquanto animais diabéticos devem apresentar glicemia acima de 400 mg/dL em um modelo eficaz do estado diabético. Assim, os achados do presente estudo confirmam o estado diabético dos animais e demonstram a parcial eficácia do tratamento com insulina no controle dos níveis glicêmicos.

Na insulinoterapia com 6U diárias, observou-se a reverção parcial dos níveis glicêmicos. O aumento de peso corporal durante a insulinoterapia demonstra claramente que a insulina está contribuindo para melhorar o controle do metabolismo da glicose. De acordo com estudos anteriores, percebe-se a dificuldade de normalizar a glicemia durante a insulinoterapia em ratos (FREITAS et al., 2008; OKAMOTO et al., 2011). Além disso, sabe-se que tanto o excesso de insulina plasmática, como a hiperglicemia promovem resistência à insulina (BLONDEL; PORTHA, 1989; FREITAS et al., 2008; OKAMOTO et al., 2011).

Quando avaliou-se o peso das glândulas salivares submandibular, sublingual e parótida após a indução do diabetes (Figura 11), não evidenciou-se alterações nesse parâmetro, o que corrobora a alguns estudos (ANDERSON, 1987; ANDERSON, GARRETT; PROCTOR, 1990). Por outro lado, resultados divergentes foram observados (REUTERVING, 1986; MAHAY et.al., 2004; SABINO-SILVA et al., 2009) onde ocorreu redução do peso de glândulas salivares de ratos diabéticos. Acreditamos que o diabetes e o tratamento com insulina não foram capazes de alterar este parâmetro, o que pode estar relacionada à severidade do diabetes e ao estado de hidratação da glândula salivar.

6.2 Detecção dos sensores de glicose T1R2 e T1R3 e sua participação na translocação do SGLT1

A descrição de novas proteínas que podem desencadear a translocação do SGLT1 é essencial para desvendar a complexa regulação da expressão deste cotransportador na membrana luminal de células ductais de glândulas salivares. A expressão do SGLT1 na membrana luminal de células ductais aumentou após a estimulação de fibras ganglionares simpáticas que inervam as glândulas salivares, o que foi revertido pelo bloqueio da via dos receptores β -adrenérgicos-adenilatociclase-AMPC-PKA por propranolol (SABINO-SILVA et al., 2013). Além disso, os animais hipertensos SHR, que apresentam normoglicemia e aumento da atividade simpática para as glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2010a),

tiveram aumento da expressão de SGLT1 na membrana luminal de células ductais em glândulas parótidas e submandibulares (SABINO-SILVA et al., 2013). Por outro lado, em animais diabéticos foi demonstrado redução da atividade simpática para as glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2010a) e aumento da expressão de SGLT1 na membrana luminal de células ductais de glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2009; SABINO-SILVA et al., 2013), o que indica a presença de uma via de regulação de translocação independente da atividade simpática. Corroborando a presença desta via independente da atividade simpática, foi descrito um aumento adicional da presença de SGLT1 em células ductais de glândulas salivares de ratos SHR diabéticos que apresentam alta atividade simpática para as glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2013). Desta maneira, buscou-se investigar a presença de um outra via intracelular envolvida na translocação do SGLT1 em células ductais.

Os monossacarídeos luminiais, metabolizáveis e não metabolizáveis, do epitélio intestinal regulam a expressão do SGLT1 em muitas espécies (VAYRO et al., 2001; MARGOLSKEE et al., 2007). Os sensores de monossacarídeos intestinais voltados para a face externa da membrana luminal apresentam alta especificidade para glicose (DYER et al., 2003). No intestino, a detecção de diferentes níveis de glicose luminal ocorre por meio da ativação do heterodímero T1R2/T1R3 presente na membrana apical dos enterócitos (MARGOLSKEE et al., 2007; KELLETT et al., 2008; STEARNS et al., 2010; MERIGO et al., 2011). Dessa forma, a presença de glicose ativa o heterodímero T1R2/T1R3 e inicia uma sinalização pela ativação da via da adenilato ciclase-AMPC-PKA, independente do metabolismo da glicose, o que leva ao aumento da expressão do SGLT1 na membrana luminal de enterócitos (DYER et al., 2003).

Sabendo que a regulação da expressão do SGLT1 na membrana apical de enterócitos, depende da presença de glicose no lúmen intestinal, acreditamos inicialmente que uma regulação similar poderia ocorrer nas glândulas salivares. A análise dos estudos de imunohistoquímica mostrou a presença dos sensores T1R2 (Figura 12) e T1R3 (Figura 13) na membrana basolateral de células ductais de glândulas submandibulares, o que difere da marcação apical em enterócitos. Desta maneira, demonstramos pela primeira vez a presença dos sensores de glicose T1R2 e T1R3 nas glândulas salivares. Não temos conhecimento de outros estudos que demonstraram estes sensores de glicose na membrana basolateral de outras células. Desta forma, a presença dos sensores de glicose T1R2 e T1R3 na membrana basolateral de células ductais de glândula submandibular indica que a glicose presente no líquido extracelular pode promover o aumento da ativação destes sensores, o que não ocorre com a glicose presente na saliva.

É importante destacar que a F-actina tem alta expressão ancorada na face interna da membrana plasmática (SAARIKANGAS; ZHAO; LAPPALAINEN, 2010). No entanto, é possível que uma pequena parte da expressão possa também ocorrer em células mioepiteliais que ficam envoltas ao redor das células ductais pois com a F-actina, não é possível a distinção destas duas células comumente. Considerando a impossibilidade técnica de isolamento de células ductais da glândula submandibular para quantificação da expressão das proteínas sensoras de glicose, não foi possível uma análise da expressão quantitativa da presença destas proteínas entre animais normoglicêmicos e diabéticos.

Para avaliação da participação funcional dos sensores de glicose na translocação do SGLT1 em glândulas salivares, foi injetada uma solução rica em glicose na artéria da glândula submandibular direita e salina fisiológica no lado oposto (sendo esta considerada um controle autógeno). Com a administração de glicose na artéria espera-se que ela aumente sua concentração no líquido extracelular e possa ativar os sensores de glicose da membrana basolateral das células ductais. Roder e colaboradores (2014) também mostraram o papel do SGLT1 na absorção intestinal de glicose após administração intragástrica de solução glicosada. A análise imuno-histoquímica para o SGLT1 demonstrou aumento na marcação desta proteína na membrana luminal das células ductais das glândulas que receberam a solução com alta concentração de glicose, o que indica um provável papel funcional para os sensores de glicose T1R2/T1R3 nas glândulas salivares.

Os sensores de glicose T1R2/T1R3 presentes em enterócitos podem ativar a PKA e a fosforilação desta proteína pode promover a translocação de SGLT1 para a membrana luminal de enterócitos (DYER et al., 2003, MARGOLSKEE et al., 2007) e de células acinosas e ductais de glândulas salivares (SABINO-SILVA et al., 2010a; SABINO-SILVA et al., 2013). Isto sugere que em células ductais de glândulas salivares, o aumento da concentração de glicose do líquido extracelular é detectado pelo heterodímero T1R2/T1R3, promovendo o aumento da ativação da via da PKA e a translocação do SGLT1 para a membrana luminal.

6.3 Fluxos de água e glicose em ductos de glândulas salivares

A descrição do mecanismo de transporte de glicose através do SGLT1 e a compreensão da sua função na glândula salivar são essenciais para compreender os fluxos de glicose e de água na secreção salivar.

A capacidade do SGLT1 transportar água foi demonstrada em oócitos e em enterócitos (LOO; WRIGHT; ZEUTHEN, 2002; WRIGHT et al., 2004). Em células ductais de glândulas

salivares foi demonstrado que o aumento de SGLT1 na membrana luminal de ratos diabéticos e/ou hipertensos, estava relacionado com a redução da secreção salivar não-estimulada (SABINO-SILVA et al., 2009; SABINO-SILVA et al., 2013). No entanto, o único trabalho que realizou o bloqueio farmacológico de SGLT1 na membrana luminal de células ductais, não descreveu dados sobre o fluxo salivar nestas condições (TAKAI; YOSHIDA; KAKUDO, 1983).

O epitélio ductal sempre foi considerado um território de permeabilidade muito baixa para a água (MARTINEZ, 1987), ou até impermeável (TURNER; SUGIYA, 2002). É importante destacar que a permeabilidade não foi avaliada em modelos experimentais que apresentam redução da secreção salivar. Além disso, os experimentos originais de microperfusão de glândulas salivares foram realizados nas décadas de 60 e 70 (YOUNG, 1968; YOUNG et al., 1970; MARTIN; YOUNG, 1971; MANGOS et al., 1973) e não tem sido revalidados nas últimas décadas. Desta forma, o presente trabalho pode promover uma quebra de paradigma na informação de que os ductos salivares são praticamente impermeáveis à água mesmo em condições fisiológicas. Isto pode ser comprovado, pelo aumento do fluxo salivar após a administração de florizina intraductal em animais normoglicêmicos.

Além disso, o presente trabalho demonstrou que após o bloqueio de SGLT1 ductal com florizina, ocorreu um maior aumento proporcional do fluxo salivar em ratos diabéticos comparado com os não-diabéticos, o que corrobora o aumento da expressão do SGLT1 em células ductais de glândulas submandibulares de animais diabéticos (SABINO-SILVA et al., 2009; SABINO-SILVA et al., 2013). Isto também pode indicar que ocorre manutenção da função do SGLT1 após o aumento da translocação nesta condição experimental. Desta maneira, propomos que a florizina, ao bloquear o SGLT1, diminui a reabsorção de água por estes transportadores, aumentando assim o fluxo salivar.

Em outros territórios a florizina promove bloqueio do transporte de água. Nos rins, a florizina aumenta a depuração de água renal (BISHOP et al., 1978) e ela interfere com a circulação de água nas preparações intestinais *in vitro*, aumentando o volume de fluido no intestino (PARSONS; SMYTH; TAYLOR, 1958).

A redução do fluxo salivar estimulado por pilocarpina em animais diabéticos (que receberam microinjeção intraductal de salina) corrobora outros trabalhos da literatura que demonstraram redução da secreção salivar em diabéticos (CONNER et al., 1970; DODDS; YEH; JOHNSON, 2000; CARDA et al., 2006), mas difere de outros estudos (DODDS; DODDS, 1997; MEURMAN et al., 1998; SOARES et al., 2004; AYDIN, 2007). A diminuição

do fluxo salivar encontrada em diabéticos pode ser causada pelo aumento da diurese (poliúria), que conseqüentemente, diminui o líquido extracelular consideravelmente, e como consequência, diminui a produção de saliva. Essa diminuição da produção de saliva, pode ser multifatorial, e ocorrer devido à presença de infiltrados de células gordurosas nas glândulas salivares, neuropatias que afetam as glândulas salivares, diminuição da atividade simpática e parassimpática, e também devido ao uso de drogas para o tratamento do diabetes (SHARON et al., 1985; TENOVUO et al., 1986; PAL, et al., 2003; CARDA et al., 2006; SABINO-SILVA, 2010a).

É importante reiterar o provável percurso da molécula de glicose do sangue até o lúmen salivar antes de discutir os dados de reabsorção de glicose ductal. Devido à presença dos capilares fenestrados a concentração de glicose plasmática e do líquido extracelular são semelhantes. Acredita-se que a glicose use a rota paracelular, em um fluxo acoplado com a água, entre as células acinosas de glândulas salivares para atingir o lúmen (TAKAI; YOSHIDA; KAKUDO, 1983). No sistema ductal foi descrito apenas o transportador SGLT1 na membrana luminal (SABINO-SILVA et al., 2009). Dados ainda não publicados do nosso grupo indicam a presença do transportador de glicose GLUT1 na membrana basoteral de células ductais de ratos normoglicêmicos e diabéticos.

A glicose é uma molécula pequena capaz de mover-se facilmente através das membranas dos vasos sanguíneos, passando do plasma sanguíneo para o líquido extracelular e após ao fluido gengival. O fluido gengival pode se misturar a saliva através do sulco gengival (BELAZI et al., 1998). Desta maneira, a concentração glicose da saliva coletada diretamente da cavidade oral pode ser diferente da saliva coletada diretamente do ducto de glândulas salivares.

No presente trabalho, a concentração de glicose salivar foi aumentada em animais diabéticos tratados com salina e florizina quando comparada com seus respectivos controles normoglicêmicos. Porém, a florizina não promoveu efeito na concentração de glicose dos animais normoglicêmicos tratados com salina, quando comparados com os normoglicêmicos tratados com florizina.

O aumento da concentração de glicose salivar em ratos normoglicêmicos promovido pela florizina injetada dentro do ducto da glândula submandibular foi descrito por Takai e colaboradores (1983), no qual a estimulação da secreção salivar ocorreu pelo estímulo elétrico do nervo corda-lingual que inerva a glândula submandibular. Este estudo também demonstrou que a relação entre a concentração de glicose e taxa de fluxo salivar era independente do fluxo em animais controles e foi observada uma hipérbole retangular com o aumento dos níveis de

glicose sob fluxo salivar diminuído após administração de oubaína (um antagonista da bomba de sódio-potássio-ATPase) na artéria submandibular, o que mimetiza a ação da florizina na membrana luminal. Desta maneira acreditamos que a falta de efeito da florizina em animais normoglicêmicos pode ter ocorrido devido a concentração de glicose salivar muito elevada (40,6 mg/dL) em um animal ND-salina. No caso dos diabéticos, em que se espera um aumento da captação de glicose, acreditamos que a explicação pode ocorrer por um efeito relacionado ao fluxo salivar após a administração de florizina.

Pelo nosso conhecimento, a relação entre a concentração de glicose salivar e a secreção salivar estimulada por pilocarpina coletada diretamente do ducto de glândulas submandibulares foi demonstrada pela primeira vez na literatura. Não foi observada correlação entre esses dois parâmetros.

O efeito de captação de glicose pelo SGLT1 foi demonstrado pela avaliação da excreção total de glicose entre animais com glicemias similares, em que se espera concentração de glicose salivar semelhantes na saliva primária e na saliva secretada na cavidade oral. Como esperado a excreção de glicose foi aumentada com a presença de florizina no lúmen dos ductos salivares nos diabéticos e diabéticos tratados com insulina. Porém, apesar do aumento de 27% da excreção de glicose salivar em ratos não-diabéticos com administração intraductal de florizina em comparação com a administração intraductal de salina, não houve diferença estatística.

Já era conhecido a presença da expressão do mRNA do gene SLC2A2 em glândulas salivares (JURYSTA et al., 2013) e pelo nosso conhecimento, o presente estudo identificou o transportador de glicose GLUT2 pela primeira vez em células ductais de ratos diabéticos (Figura 20). O GLUT2 é um transportador de glicose, que possui uma baixa afinidade e alta capacidade de transporte de glicose (MUECKLER, 1994). Estudos mostram que o GLUT2 também pode ser recrutado das vesículas intracelulares para a membrana basolateral, permitindo o transporte de glicose para o interstício em ratos diabéticos (MARKS et al., 2003) juntamente com o GLUT1.

Estudos realizados em crianças diabéticas, onde a saliva estimulada foi coletada de glândulas parótidas, apresentaram correlação entre a concentração de glicose salivar e a glicemia (REUTERVING et al., 1987; KARJALAINEN; KNUUTTILA; KÄÄR, 1996). Estes dados estão de acordo com presente estudo, que mostrou correlação significativa entre a glicemia e a concentração de glicose salivar em animais normoglicêmicos e diabéticos, porém difere de outros estudos, onde esta correlação não foi identificada (KJELLMAN, 1970a;

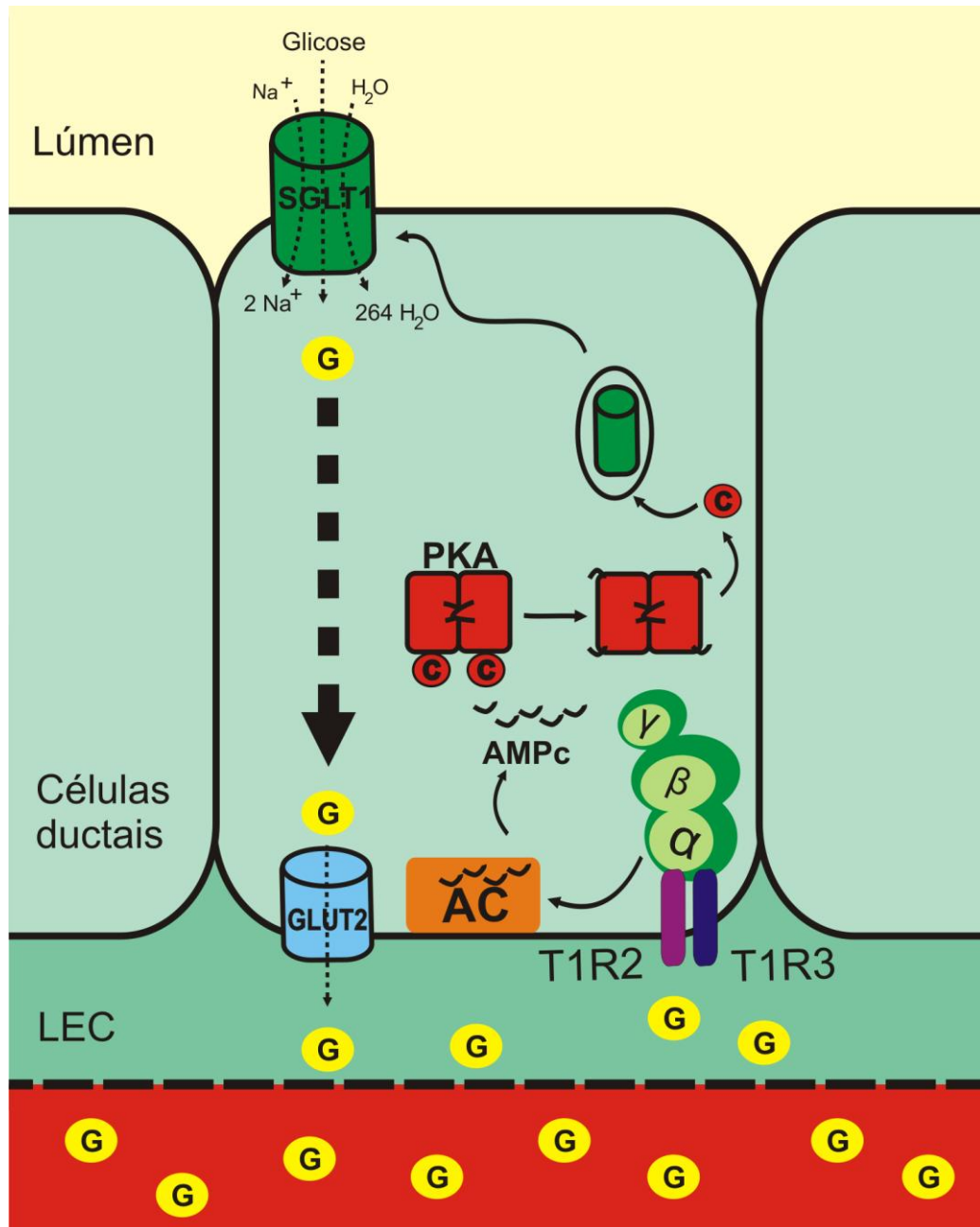
FORBAT et al., 1981; BEN-ARYEH et al., 1988; CARDA et al., 2006; JURYSTA, et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2010).

Vários fatores podem ser responsáveis pelas diferenças entre a correlação das concentrações de glicose no sangue e na saliva devido à diferença no método de coleta da saliva. Entre estes fatores estão a retenção oral de carboidratos alimentares (HASE et al., 1994), a utilização da glicose pelas bactérias orais (JONG et al., 1984) e a liberação de carboidratos à partir de glicoproteínas salivares (LEACH; CRITCHLEY, 1966; LEACH; MELVILLE, 1970). Além disso, a presença do fluido gengival, que apresenta alta concentração de glicose, pode alterar a concentração de glicose da saliva coletada na cavidade oral. Esta liberação do fluido gengival é aumentada em pacientes com gengivites e periodontites (KJELLMAN, 1970b; FICARA et al., 1975).

Múltiplos fatores fisiológicos podem contribuir para comprometer a função salivar no diabetes mellitus frequentemente devido a alterações hormonais, microvasculares e neuronais, o que compromete a funcionalidade de vários órgãos (CHAVEZ et al., 2000). Alterações microvasculares são capazes de comprometer a habilidade das glândulas salivares de responder à estimulação hormonal ou neural. Além disso, a secreção salivar é controlada pelo sistema nervoso autônomo, e isto possibilita que a neuropatia possa interferir com a habilidade de resposta individual à estimulação das glândulas salivares, alterando o fluxo e composição salivar (VASCONCELOS et al., 2010).

Em resumo, a figura 21 ilustra o percurso sugerido para as moléculas de água e glicose em células ductais de animais controles e diabéticos.

FIGURA 21 - Modelo ilustrativo da ativação dos sensores de glicose T1R2/ T1R3 e do mecanismo de reabsorção de glicose e água via SGLT1 e GLUT2 em células de ducto estriado de glândulas submandibulares.



Fonte: Autor, 2014.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram pela primeira vez a presença de sensores de glicose T1R2 e T1R3 na membrana basolateral de células ductais de glândulas submandibulares de animais normoglicêmicos e diabéticos. Acreditamos que os sensores T1R2 e T1R3 estimulados pela glicose proveniente do líquido extracelular, sofrerão uma mudança conformacional que promoverá a liberação da subunidade α de proteínas G. Logo após ocorrerá a ativação da adenilatociclase, produzindo AMPc, que ativa a via da PKA, que ao liberar a subunidade catalítica, causará a translocação do SGLT1. Propomos assim que o SGLT1 irá captar a glicose proveniente do lúmen ductal, que intracelularmente poderá ser metabolizada ou reabsorvida para o LEC, via transportador de glicose GLUT2 na membrana basolateral. Sendo assim, propomos uma nova via de ativação molecular que promove translocação do SGLT1 em glândulas salivares.

Adicionalmente, demonstrou-se que a presença de glicose no meio extracelular induz o aumento da expressão da proteína SGLT1 em membrana luminal de célula ductal, indicando que nestas condições a reabsorção glandular de glicose e água esteja aumentada. Este aumento de reabsorção de água pode ser um mecanismo importante para redução da secreção salivar no diabetes. Desta forma, estes achados contribuem para o entendimento das alterações de fluxo salivar e composição da saliva frequentemente associadas ao diabetes mellitus.

REFERÊNCIAS

AMANO, O. et al. Anatomy and Histology of Rodent and Human Major Salivary Glands. **Acta Histochem. Cytochem.** v. 45, n.5, p. 241–250, 2012.

ANDERSON, L.C. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. **Am J Physiol.** v. 245, p. 431-437, 1983.

ANDERSON, L.C. et al. In vivo secretory responses of submandibular glands in streptozotocin-diabetic rats to sympathetic and parasympathetic nerve stimulation. **Cell Tissue Res.** v. 274, p. 559-566, 1993.

ANDERSON, L.C. Parotid gland function in streptozotocin-diabetic rats. **J Dent Res.** v. 66, p. 425-429, 1987.

ANDERSON, L.C.; GARRETT, J.R.; PROCTOR, G.B. Morphological effects of sympathetic stimulation on rat parotid glands 3-4 weeks after the induction of streptozotocin diabetes. **Arch Oral Biol.** v. 35, p. 829-838, 1990.

ANDERSON, L.C.; SULEIMAN, A.H.; GARRETT, J.R. Morphological effects of diabetes on the granular ducts and acini of the rat submandibular gland. **Microsc Res Tech.** v. 27, p. 61-70, 1994.

APS, J.K.M.; MARTENS, L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. **Forensic Science International.** v. 150, p. 119–131, 2005.

AYDIN, S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. **J Biochem Mol Biol.** v. 40, p. 29-35, 2007.

BACHMANOV, A.A. et al. Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. **Chem Senses.** v. 26, p. 925-933, 2001.

BAKRIS, G.L. et al. Renal sodium-glucose transport: role in diabetes mellitus and potential clinical implications. **Kidney Int.** v. 75, p. 1272-1277, 2009.

BELAZI, M.A. et al. Salivary alterations in insulin-dependent diabetes mellitus. **Int J Paediatr Dent.** v. 8, p. 29-33, 1998.

BELL, G.I et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**. v. 13, p. 198-208, 1990.

BEN-ARYEH, H. et al. Salivary composition in diabetic patients. **J Diabetic Complications**. v.2, p. 96-99, 1988.

BISHOP, J.H.V. et al. Effects of phlorizin on glucose, water and sodium handling by the rat kidney. **J. Physiol**. v. 275, p. 467-480, 1978.

BLONDEL, O.; PORTHA, B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. **Diabetes and Metabolism**. v.15, p. 382-387, 1989.

CALDEIRA, E.J. et al. Morphometric analysis and ultrastructure of the epithelium of the oral mucosa in diabetic autoimmune NOD mice. **Braz J Morphol Sci**. v. 21, p. 197-205, 2004.

CALDEIRA, E.J; CAMILLI, J.A.; CANGNON, V.H.A. Stereology and ultrastructure of the salivary glands of diabetic nod mice submitted to long-term insulin treatment. **The Anatomical Record** part a v. 286a, p. 930-937, 2005.

CAMPBELL, M.J. Glucose in the saliva of the non-diabetic and the diabetic patient. **Arch Oral Biol**. v.10, p. 197-205, 1965.

CARDA, C. et al. Structural and functional salivary disorders in type 2 diabetic patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 11, p. 309-314, 2006.

CARPENTER, G.H. et al., The influence of nerves on the secretion of immunoglobulin A into submandibular saliva in rats. **J Physiol**. v. 15, p. 567-573. 1998.

CARRUTHERS, A. Facilitated diffusion of glucose. **Physiol Rev**. v. 70, p. 1135-1176, 1990.

CATALÁN, A.M.; NAKAMATO, T.; MELVIN, J.E. The salivary gland fluid secretion mechanism. **J. Med. Invest.**, v. 56, p. 192-196, 2009.

CHANDRASHEKAR, J. et al. The receptors and cells for mammalian taste. **Nature**.v. 444, p.288-294, 2006.

CHAVEZ, E.M. et al. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 89, p. 305-311, 2000.

CONNER, S.; IRANPOUR, B.; MILLS, J. Alteration in parotid salivary flow in diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 30, p. 55-9, 1970.

DAVID-SILVA, A. et al. Hepatocyte nuclear factors 1 α /4 α and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. **Life Sci.** v. 93, n. 22, p. 805-813, 2013.

DAVIDSON, M.B. **Diabetes Mellitus- Diagnosis and Treatment**, 3rd Edition, Churchill Livingstone, New York, 1991.

DEBNAM, E.S.; LEVIN, R.J. An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured in vivo. **J Physiol.** v. 246, p. 181-196, 1975.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. Influence of intensive diabetes treatment on body weight and composition of adults with type 1 diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care** . v. 24, p. 1711–1721, 2001.

DODDS, M.W.; DODDS, A.P. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 83, p. 465-470, 1997.

DODDS, M.W.J.; YEH, C.K.; JOHNSON D.A. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. **Community Dent Oral Epidemiol.** v. 28, p. 373-381, 2000.

DYER J. et al. Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. **Biochem Soc Trans.** v. 33, p 302-305, 2005.

DYER, J. et al. Glucose sensing in the intestinal epithelium. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 3377–3388, 2003.

EDGAR, W.M. Saliva: its secretion, composition and functions. **Br Dent J.** v. 172, p. 305-312, 1992.

EDGAR, W.M. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. **Br Dent J.** v. 169, p. 96-98, 1990.

EHRENKRANZ, J.R. et al. Phlorizin: a review. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 21, p. 31–38, 2005.

FICARA, A.J. et al. A comparison of the glucose and protein content of gingival fluid from diabetics and nondiabetics. **Journal of Periodontal Research**. v. 10, n. 3, p. 171-175, 1975.

FORBAT, L.N. et al. Glucose concentrations in parotid fluid and venous blood of patients attending a diabetic clinic. **J R Soc Med**. v. 74, p. 725-728, 1981.

FREITAS, H. S. et al. Na-Glucose Transporter-2 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Kidney of Diabetic Rats Correlates with Glycemic Levels: Involvement of Hepatocyte Nuclear Factor-1. Expression and Activity. **Endocrinology**. v. 149, n. 2, p. 717-724, 2008.

FREITAS, H.S. et al. Insulin but not phlorizin treatment induces a transient increase in GLUT2 gene expression in the kidney of diabetic rats. **Nephron Physiol**. v. 105, p. 42-51, 2007.

FULLERTON, P.M.; PARSONS, D.S. The absorption of sugars and water from rat intestine *in vivo*. **Experimental Physiology**. v. 41, p. 387-397, 1956.

GARRETT, J.R. The proper role of nerves in salivary secretion. **J Dent Res**. v. 66. p. 387-397, 1987.

GREABU, M. et al. Saliva - a diagnostic window to the body, both in health and in disease. **Journal of Medicine and Life**. v. 2, n. 2, p. 124-132, 2009.

GREGORI, C.; COSTA, A. A.; CAMPOS, A. C. O paciente com diabetes melito. **RPG**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 166-174, 1999.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab**. São Paulo. v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

HASE, J.C. Oral retention of glucose at pharmacologically reduced salivary flow in man. **Scandinavian Journal of Dental Research**. v. 102, n. 3, p. 180-185, 1994.

HE, C.X. Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration. **World J Gastroenterol**. v. 10, p. 567-572, 2004.

HIRSCH, J.R.; LOO, D.D; WRIGHT, E.M. Regulation of Na⁺/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes. **J Biol Chem**. v. 271, p. 14740-14746, 1996.

HOE S. Z. et al. Preliminary study on saliva from diabetic and non-diabetic individuals by polyacrylamide gel electrophoresis. **Annals of Dentistry**, University of Malaya v. 4, n.1, 1997.

HÖFER, D.; DRENCKHAHN, D. Identification of the taste cell G-protein, alpha-gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system. **Histochem Cell Biol.** v. 110, n. 3, p. 303-309, 1998.

HU, Y. et al. Functional changes in salivary glands of autoimmune disease-prone NOD mice. **Am J Physiol.** v. 263, p.607–614, 1992.

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent**, v. 85, p. 162-169, 2001.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 6th edn. Brussels, Belgium: **International Diabetes Federation**, 2013.

JONG, M.H. Growth of oral Streptococcus species and Actinomyces viscosus in human saliva. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 47, n. 5, p. 901-904, 1984.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

JURYSTA, C. et al. Comparison of GLUT1, GLUT2, GLUT4 and SGLT1 mRNA Expression in the Salivary Glands and Six Other Organs of Control, Streptozotocin-Induced and Goto-Kakizaki Diabetic Rats. **Cell Physiol Biochem.** v.31, p.37-43,2013.

JURYSTA, C. et al. Glucose transport by acinar cells in rat parotid glands. **Cell Physiol Biochem.** v. 29, p. 325-330, 2012.

JURYSTA, C. et al. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. **J Biomed Biotechnol.** p.1-6, 2009.

KARJALAINEN, K.M.; KNUUTTILA, M.L.; KÄÄR, M. Salivary factors in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatr Dent.* v.18,p. 306-311, 1996.
KELLETT, G.L. et al. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. **Annu Rev Nutr.** v. 28, p. 35-54, 2008.

KJELLMAN, O. Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus. **Odontol Revy.** v. 21, p. 159-168, 1970a.

KJELLMAN, O. The presence of glucose in gingival exudates and resting saliva of subjects with insulin-treated diabetes mellitus. **Sven Tandlak Tidskr.** v. 63, n. 1, p. 11-19, 1970b.

LANGLEY, et al. Secretion of Glucose-C14 by dog parotid gland. **Arch Oral Biol.** v. 8, p. 127-133, 1963.

LEACH, S.A.; CRITCHLEY, P. Bacterial degradation of glycoprotein sugars in human saliva. **Nature.** v. 299, n.5022, p. 506, 1966.

LEACH, S.A.; MELVILLE, T.H. Investigation of some human oral organisms capable of releasing the carbohydrates from salivary glycoproteins. **Archives of Oral Biology.** v. 15, n. 1, p. 87-88, 1970.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; GALL, M. L . GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. **Am J Physiol Endocrinol Meta.** v. 296, p. 985–992, 2009.

LI , X. et al. Human receptors for sweet and umami taste. **Proc Natl Acad Sci. USA.** v. 99, p. 4692-4696, 2002.

LIN, B.P. et al. Dental caries in older adults with diabetes mellitus. **Spec Care Dentist.** v. 19, p. 8-14, 1999.

LÖFGREN, C.D. et al. A systematic review of methods to diagnose oral dryness and salivary gland function. **BMC Oral Health.** v. 8: p. 12-29, 2012.

LOO, D.D.; WRIGHT, E.M.; ZEUTHEN, T. Water pumps. **J Physiol.** v. 542, p. 53–60, 2002.

MAHAY, S. et al. 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.** v.261, p. 175-181, 2004.

MAKINO, S. et al. Breeding of non-obese diabetic strain of mice. **Jikken Dobutsu.** v.1, p.1-13. 1980.

MANDEL, I.D. et al. The carbohydrates of human parotid saliva. **Arch Oral Biol.** v. 3, p. 278-282, 1961.

MANGOS, J.A.; MARAGOS, N.; MCSHERRY, N.R. Micropuncture and microperfusion study of glucose excretion in rat parotid saliva. **Am J Physiol.** v. 224, n.6, p. 1260-12644, 1973.

MARGOLSKEE, R.F. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. **J Biol Chem.** v. 277, n. 1, p.1-4, 2002.

MARGOLSKEE, R.F. et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. **Proc Natl Acad Sci. U S A.** v. 104, n. 38, p. 15075-15080, 2007.

MARTIN, C.J.; YOUNG, J.A. A microperfusion investigation of the effects of a sympathomimetic and a parasympathomimetic drug on water and electrolyte fluxes in the main duct of the rat submaxillary gland. **Pflugers Arch.** v. 327, n.4, p. 303-323, 1971.

MCLAUGHLIN, S.K.; MCKINNON, P.J.; MARGOLSKEE, R.F. Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. **Nature.** v. 357, p. 563-569, 1992.

MARKS, J. et al. Diabetes increases facilitative glucose uptake and GLUT2 expression at the rat proximal tubule brush border membrane. **J Physiol.** v. 553, p. 137-45, 2003.

MARTINEZ, J.R. Ion transport and water movement. **J Dent Res.** v. 66, p. 638-47, 1987.

MASHARANI, U.; KARAM, J.H. **Basic & Clinical Endocrinology**, capítulo 18, 1997.

MAX, M. et al. Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus. **Sac. Nat. Genet.** v. 28, p. 58-63, 2001.

MEALEY, B.L.; OATES, T.W. Diabetes mellitus and periodontal diseases. **J Periodontol.** v. 77, n. 8, p. 1289-1303, 2006.

MELVIN, J.E. et al. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu Rev Physiol.** v. 67, p. 445-469, 2005.

MERIGO, et al. Glucose transporters are expressed in taste receptor cells. **Journal of Anatomy.** v. 219, p.243-252, 2011.

MEURMAN, J.H. et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients subjects: the role of autonomic nervous system. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod.** v. 86, p. 69-76, 1998.

MIYAMOTO, K. et al. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. **Biochem J.** v. 295, p. 211-215, 1993.

MUECKLER, M. Review Facilitative glucose transporters Eur. **J. Biochem.** v. 219, p. 713-725, 1994.

NELSON, G. et al. Mammalian sweet taste receptors. **Cell.** v.106, p. 381–390, 2001.

NOVATO, T. S.; GROSSI, S. A. A. Fatores associados à qualidade de vida de jovens com diabetes mellitus do tipo 1. **Rev. esc. enferm. USP**, São Paulo, v. 45, n. 3, p.770-776, 2011.

OKAMOTO, M. M. et al. Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. **Journal of Endocrinology.** v. 211, p. 1-10, 2011.

OKUBO, M.; KAWAGUCHI, M. Rat Submandibular Gland Perfusion Method for Clarifying Inhibitory Regulation of GABAA Receptor. **J Pharmacol Sci.** v. 122, p. 42-50, 2013.

PAL, P. et al. Estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary total protein and periodontal microflora in diabetes mellitus. **J Indian Dent Assoc.** v. 74, p. 143-149, 2003.

PARSONS, B.J.; SMYTH, D.H.; TAYLOR, C.B. The action of phlorrhizin on the intestinal transfer of glucose and water in vitro. **J. Physiol.** v. 144, n.3, p.387-402, 1958.

PEDERSEN, A.M. et al. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Dis.** v. 8, p. 117-129,2002.

PURNELL, J.Q. et al. Effect of excessive weight gain with intensive therapy of type 1 diabetes on lipid levels and blood pressure: results from the DCCT. Diabetes Control and Complications Trial. **Journal of the American Medical Association.** v. 280, p. 140-146, 1998.

REN, X. et al. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. **Front integr neurosci.** v. 3, p. 1-15, 2009.

REUTERVING, C.O et al. Salivary flow rates and salivary glucose concentration in patients with diabetes mellitus influence of severity of diabetes. **Diabete Metab.** v. 13, p. 457-462, 1987.

REUTERVING, C.O. Pilocarpine-stimulated salivary flow rate and salivary glucose concentration in alloxan diabetic rats. Influence of severity and duration of diabetes. **Acta Physiol Scand.** v. 126, p. 511-515, 1986.

REUTERVING, C.O.; HÄGG, E.; GUSTAFSON, T. Root surface caries and periodontal disease in long-term alloxan diabetics rats. **J Dent Res.** v. 65, p. 689-694, 1986.

RODER, P. V. et al. The Role of SGLT1 and GLUT2 in Intestinal Glucose Transport and Sensing. **Plos One.** v.9, p.1-10, 2014.

ROESINK, et al. Preservation of the rat parotid gland function after Radiation by prophylactic pilocarpine treatment: radiation dose dependency and compensatory mechanisms. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** v. 45, n. 2, p. 483-489, 1999.

ROSSETTI, L. et al. Correction of Hyperglycemia with Phlorizin Normalizes Tissue Sensitivity to Insulin in Diabetic Rats. **J Clin Invest.** v. 79, n. 5, p. 1510-1515, 1987.

RUHL, S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. **Expert Rev Proteomics.** v. 9, n.1, p. 85-96, 2012.

SAARIKANGAS, J.; ZHAO,H; LAPPALAINEN, P. Regulation of the Actin Cytoskeleton-Plasma Membrane Interplay by Phosphoinositides. **Physiological Reviews.** v.90, n.1, p. 259-89, 2010.

SABINO-SILVA, R. et al. Increased SGLT1 expression in salivary gland ductal cells correlates with hyposalivation in diabetic and hypertensive rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome.** v.64, p. 1-5, 2013.

SABINO-SILVA, R. et al. Na⁺-Glucose Cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. **J Memb Biol.** v. 228, p. 63-69, 2009.

SABINO-SILVA, R. et al. SGLT1 protein expression in plasma membrane of acinar cells correlates with the sympathetic outflow to salivary glands in diabetic and hypertensive rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 299, p. E1028-E1037, 2010a.

SABINO-SILVA, R. et al. The Na⁺/glucose cotransporters: from genes to therapy . **Braz J Med Biol Res Online Provisional Version.** 2010b.

SAINZ, E. et al. Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. **J Neurochemistry**. v. 77, p. 896-903, 2001.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.G.; SCHÜRMAN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**. v. 28, p. 364-371, 2004.

SHARON, A., et al. Salivary composition in diabetic patients. **J Oral Med**. v.40, p.23-26, 1985.

SICREE, R.; SHAW, J.E.; ZIMMET, P.Z. The global burden of diabetes. In: Gan D (Editor), Diabetes atlas. 2nd edn. **Brussels: International Diabetes Federation**; p 15-71, 2003.

SOARES, M.S.M. et al. Fluxo Salivar e consumo de medicamentos em diabéticos idosos. **Arquivos em Odontologia**. v.40, n.1, p. 101-110, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Atualização brasileira sobre diabetes. Rio de Janeiro. **Diagraphic**. 2006.

SOUSA, R. R. et al. O Paciente Odontológico Portador de Diabetes Mellitus: Uma Revisão da Literatura. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. João Pessoa, v. 3, n. 2, p. 71-77, 2003.

STEARNS, A. T. Rapid upregulation of sodium glucose transporter SGLT1 in response to intestinal sweet taste stimulation. **Ann Surg**. n. 251, p. 865-871, 2010.

TAKAI, N.; YOSHIDA, Y.; KAKUDO, Y. Secretion and Re-absorption of Glucose in Rat Submandibular and Sublingual Saliva. **J Dent Res**. v. 62, n. 10, p. 1022-1025, 1983.

TANDLER, B. et al. Comparative Ultrastructure of Intercalated Ducts in Major Salivary Glands: A Review. **The Anatomical Record**. v. 252, p. 64-91, 1998.

TANDLER, B. et al. Secretion by striated ducts of mammalian major salivary glands: review from an ultrastructural, functional, and evolutionary perspective. **The Anatomical Record**. Review. v. 264, n. 2, p. 121-145, 2001.

TANDLER, B.; PINKSTAFF, C.A; PHILLIPS, C.J. Interlobular Excretory Ducts of Mammalian Salivary Glands: Structural and Histochemical Review. **The Anatomical Record**. Part A. v. 288A p. 498–526, 2006.

TARPEY, P.S. et al. Aminoacid sequence and the cellular location of the Na(+)-dependent D-glucose symporters (SGLT1) in the ovine enterocyte and the parotid acinar cell. **Biochem J.** v. 312, p. 293-300, 1995.

TENOVUO, J. et al. Oral health of patients with insulin dependent diabetes mellitus. **Scand J Dent Res.** v. 94, p. 338-346, 1986.

THAYSEN, J.H.; THORN ,N.A.; SCHWARTZ, I.L. Excretion of sodium, potassium, chloride e carbon dioxide. **Am J Physiol.** v. 178, p. 155-159, 1954.

THAYSEN, J.H.; THORN, N.A.; SCHWARTZ, I.L. Excretion of sodium, potassium, chloride e carbon dioxide in human parotid saliva. **Am J Physiol.** v.178, p. 155-159, 1954.

THORENS, B. et al. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. **Cell.** v. 55, p. 281–290, 1988.

THORENS, B. et al. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** v. 259, p. 279-285, 1990.

THORENS, B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal and liver glucose fluxes. **Am J Physiol.** v. 270, p. 541-553, 1996.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 298, p 141–145, 2010.

TOYONO, T. et al. Differential expression of the glucose transporters in mouse gustatory papillae. **Cell Tissue Res.** v. 345, p. 243–252, 2011.

TURNER, R.J.; SUGIYA, H. Understanding salivary fluid and protein secretion. **Oral Dis.;** v. 8, p. 3-11, 2002.

VASCONCELOS, A.C.U. et al. Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. **Journal of Oral Science.** v. 52, n. 2, p. 293-298, 2010.

VATTA, M.S et al. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. **Auton Autacoid Pharmacol.** v. 22, p. 65-71. 2002

VAYRO, S. et al. Transcriptional regulation of the ovine intestinal Na⁺/glucose co-transporter SGLT1 gene: the role of HNF-1 in glucose activation of promoter function. **Eur J Biochem.** v. 268, n.20, p. 5460-5470, 2001.

WRIGHT, E. M. et al. Surprising Versatility of Na⁺-Glucose Cotransporters: SLC5 . **Physiology.** v. 19, p. 370–376, 2004.

WRIGHT, E. M.; HIRAYAMA, B.A.; LOO D. F. Active sugar transport in health and disease. **Journal of Internal Medicine.** v. 261, p. 32-43, 2007.

WRIGHT, E.M.; HIRAYAMA, B.A.; LOO D.F. Biology of human sodium glucose transporters. **Physiol Rev.** v. 91, p. 733-794, 2011.

WRIGHT, E.M.; TURK, E. The sodium/glucose cotransport family SLC5. **Pflugers Arch.** v. 447, p. 510-518, 2004.

XU, H. et al. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. **PNAS.** v.101, n. 39, p. 14258-14263, 2004.

YOUNG, J. A., et al. A microperfusion investigation of bicarbonate secretion by the rat submaxillary gland. The action of a parasympathomimetic drug on electrolyte transport. **Pflugers Arch.** v.319, p. 185-199, 1970.

YOUNG, J.A. Microperfusion investigation of chloride fluxes across the epithelium of the main excretory duct of the rat submaxillary gland. **Pflugers Arch.**v. 303, n.4, p. 366-374,1968.

ZALEWSKA, A. et al. Impact of salivary flow and lysozyme content and output on the oral health of rheumatoid arthritis patients. **Postepy Hig Med Dosw.** v. 65, p. 40-45, 2011.

ZEUTHEN, T. Molecular water pumps. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** v.141, p. 97-151, 2000.

ZHAO, F.Q; KEATING, A.F. Functional properties and genomics of glucose transporters. **Curr Genomics.** v. 8, p.113-128, 2007.