



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIENCIA E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Efeitos da Hiperleptinémia na Secreção de  
Proteínas Salivares**

**Bioquímica**

Orientação: Elsa Cristina de Sousa Lamy; Célia  
Maria Miguel Antunes

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2014



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIENCIA E TECNOLOGIA**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Efeitos da Hiperleptinémia na Secreção de  
Proteínas Salivares**

**Bioquímica**

Orientação: Elsa Cristina de Sousa Lamy; Célia  
Maria Miguel Antunes

**Mestrado em Bioquímica**

Dissertação

Évora, 2014

## I. Agradecimentos

Todo o trabalho bem-sucedido é fruto de muita força de vontade e muita persistência, principalmente da colaboração de várias pessoas, nele envolvidas.

As minhas primeiras palavras de agradecimento vão para as minhas orientadoras, pois sem elas nada disto seria possível. Doutora Elsa Lamy, por todo o apoio e dedicação, pela orientação séria e meticulosa, pela crítica construtiva, pela disponibilidade de todos os momentos, pois sem ela não poderia ter percorrido este caminho, nem ter trabalhado num tema tão interessante e construtivo; Professora Doutora Célia Antunes, por ter disponibilizado o seu precioso tempo, para me mostrar o quanto minuciosa pode ser uma técnica, e como proceder para obter bons resultados.

À Senhora Dona Anabela, uma pessoa muito especial do Laboratório de Farmacologia, por ser sempre, extremamente prestável e atenciosa, e por me depositar todo um conhecimento sobre os animais em estudo.

De seguida aos meus pais e a minha mana mais linda. Sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos possivelmente não estaria aqui. Além, de todo o seu apoio, eles sempre me disponibilizaram o necessário para que o meu aproveitamento escolar dependesse apenas de mim incutindo-me, ao mesmo tempo, um grande sentido de responsabilidade.

Tenho de agradecer a todas as minhas amigas, em especial a Carla simões, colega e amiga, pela sua presença assídua em toda esta trajetória, pelo encorajamento em todos os momentos de devaneios, mas também pelas risadas e pelo companheirismo sempre depositado. Não podia deixar de agradecer as minhas “Nation’s”, sem elas esta vida académica não seria a mesma, somos e seremos uma verdadeira família, miúdas mulheres, com vontade de alcançar o topo, sempre juntas e sempre a apoiar-nos, pois como a Catarina Nation diz “A família é um sistema”, a nossa célebre frase.

Por último, mas nunca menos importante, ao meu mais que tudo, o meu pilar, o meu ídolo, aquele que sempre me recebe de braços abertos no silêncio, e me faz emergir num novo eu, obrigada por tudo, obrigada por seres quem és, TU e só TU.

Não podia deixar de colocar um poema, aquele que me identifica...

“Tua caminhada ainda não terminou  
A realidade te acolhe  
dizendo que pela frente  
o horizonte da vida necessita  
de tuas palavras  
e do teu silêncio.

Se amanhã sentires saudades,  
lembra-te da fantasia e  
sonha com tua próxima vitória.  
Vitória que todas as armas do mundo  
jamais conseguirão obter,  
porque é uma vitória que surge da paz  
e não do ressentimento.

É certo que irás encontrar situações  
tempestuosas novamente,  
mas haverá de ver sempre  
o lado bom da chuva que cai  
e não a faceta do raio que destrói.

Tu és jovem.  
Atender a quem te chama é belo,  
lutar por quem te rejeita  
é quase chegar a perfeição.  
A juventude precisa de sonhos  
e se nutrir de lembranças,  
assim como o leito dos rios  
precisa da água que rola  
e o coração necessita de afeto.

Não faças do amanhã  
o sinônimo de nunca,  
nem o ontem te seja o mesmo  
que nunca mais.  
Teus passos ficaram.  
Olhes para trás...  
mas vá em frente  
pois há muitos que precisam  
que chegues para poderem seguir-te.”

*Charles chaplin*

## II. Índice

I.	Agradecimentos	3
II.	Índice	5
III.	Índice de Figuras	7
IV.	Índice de Quadros	9
V.	Abreviaturas e Acrónimos	10
VI.	Resumo – Efeitos da Hiperleptinemia na Secreção de Proteínas Salivares	11
VII.	Abstract – Effects of hyperleptinemia in the secretion of proteins Salivary	12
VIII.	Fundamentos Teóricos	13
A.	Leptina	13
a)	O recetor da Leptina	14
b)	Mediação da Leptina	15
B.	Saliva	16
c)	Composição Salivar	17
d)	Glândulas Salivares	19
e)	Estrutura das glândulas salivares e produção de saliva	21
C.	Conceitos básicos de secreção de saliva	21
D.	Aspetos bioquímicos da saliva	22
f)	Análise global das proteínas salivares	22
IX.	Problemática	23
X.	Objetivos	24
E.	Objetivo Geral	24
F.	Objetivos Específicos	24
XI.	Estratégia	25
G.	Plano Experimental do trabalho	25
H.	Organigrama	26
XII.	Materiais e Métodos	27
I.	Animais e dieta	27
J.	Indução de hiperleptinemia em modelo animal	27
K.	Recolha de saliva mista	30
L.	Determinação dos níveis de Leptina circulantes	30
M.	Estudo Proteómico da Saliva	31
g)	Quantificação da proteína total pelo método Bradford	31
h)	Comparação dos perfis proteicos por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	31
i)	Corrida Eletroforética	32

j)	Comparação dos perfis proteicos por eletroforese bidimensional	33
N.	Análise Estatística	34
XIII.	Resultados	35
O.	Variação de Pesos e Consumos induzida por hiperleptinemia	35
P.	Níveis plasmáticos de leptina	38
Q.	Efeito da hiperleptinemia na salivação	39
R.	Alterações no perfil proteico da saliva induzidas pela hiperleptinemia	40
k)	Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)	40
l)	Eletroforese Bi-dimensional (2D)	44
XIV.	Discussão	47
XV.	Conclusão	51
XVI.	Bibliografia	52
XVII.	Anexos	58
S.	Anexo 1 – Consumos e variação de peso	58
m)	Análise Estatística do Consumo de ração	61
n)	Análise Estatística da Variação do Peso:	64
o)	Análise Estatística do Consumo em função do peso:	67
T.	Anexo 2 – Concentração proteica e Taxa de secreção de saliva	70
p)	Análise Estatística da Concentração Proteica	70
q)	Análise Estatística da taxa de secreção de saliva:	70
U.	Anexo 3 – SDS PAGE	71
r)	Análise estatística do SDS PAGE:	71
s)	Géis SDS PAGE	76
V.	Anexo 4 – Eletroforese Bi – dimensional	78
t)	Determinação dos pontos isoelétricos dos <i>spots</i> proteicos observados em géis 2-DE para tiras (IPG strips) de 13 cm, gama de pH 3-10 não linear	82
W.	Anexo 5 – Expressão das diferentes bandas na técnica SDS-PAGE	83

### III. Índice de Figuras

Figura 1 – Comportamento dos neurotransmissores mediante a ação da leptina. (adaptado de Nelson e Cox, 2000)	13
Figura 2 – (a) Resistência da leptina, e implicação desta e da adiponectina na síndrome metabólica da obesidade; (b) Biologia da leptina. (adaptado de Ricci, 2012)	14
Figura 3 – (a) Esquema representativo do efeito crescente da leptina no hipotálamo; (b) Esquema representativo do efeito contrário. (adaptado de Allison et al., 2006).	16
Figura 4 – (a) Localização das glândulas salivares principais; (b) Representação esquemática genérica de uma glândula salivar principal. (adaptado de seeley et al., 2007)	19
Figura 5 – Exemplo do resultado final de uma electroforese 2-D de saliva humana.	22
Figura 7, 8 e 9 – Início do procedimento cirúrgico.	28
Figura 6- Rato wistar submetido a anestesia geral.	28
Figura 10, 11, 12 e 13 – Rato wistar durante o procedimento cirúrgico para colocação do implante.	29
Figura 14, 15 e 16 – Fim do procedimento cirúrgico.	29
Figura 17 –Protocolo de 2D.	33
Figura 18 –Protocolo de 2D.	34
Figura 19 – Evolução do peso vivo (g) para os diferentes grupos, antes da cirurgia (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6)	35
Figura 20 – Evolução do peso diário (g) para os diferentes grupos, antes da cirurgia (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6).	36
Figura 21 – Consumo de ração absoluto (g) para o antes (dias -4 a -1) e depois da cirurgia(dias 1 a 6); Letras diferentes significam diferenças entre os grupos dentro do mesmo dia; $p < 0,05$ ;	36
Figura 22 – Consumo de ração absoluto (mg) em função do peso (g) antes (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6); Letras diferentes significam diferenças entre os grupos dentro do mesmo dia; $p < 0,05$ ; (dia 1 –89,51 $\pm$ 2,15 (controlo), 74,05 $\pm$ 2,44 (leptina); dia 2 – 68,47 $\pm$ 2,26 (controlo), 56,20 $\pm$ 2,38 (Soro), 50,88 $\pm$ 4,07 (leptina); media $\pm$ erro padrão).	37
Figura 23 – Níveis de leptina plasmática para cada grupo (ng/dl) (média $\pm$ erro padrão da média); a e b – letras diferentes significam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).	39
Figura 24 – (A) Concentração de proteína em cada grupo (media $\pm$ erro padrão); (B) Taxa de secreção de saliva (media $\pm$ erro padrão). Amostras recolhidas após a cirurgia.	40
Figura 25 – Exemplo de um perfil proteico (SDS PAGE) de diferentes amostras dos três grupos experimentais, onde mostra a variabilidade inter-individual existente. S – soro; C – controlo; L – leptina; MW – marcador de massas moleculares. As tres bandas assinaladas, bem como os rectangulos mostram exemplos de zonas onde essa variabilidade é evidente.	41
Figura 26 – Lanes representativas dos perfis proteicos para cada grupo experimental, e respetivas massas moleculares aparentes.	42

Figura 27 – Expressão (% volume) das bandas com diferenças estatisticamente significativas (banda H e H3) e da banda com tendência para baixa expressão a nível da leptina (banda E). _____	43
Figura 28 – Perfil proteico obtido por eletroforese bi-dimensional. Em cada imagem foram assinalados os spots cuja expressão foi observada como estando aumentada, relativamente ao outro grupo. A – grupo leptina; B – grupo soro. _____	44
Figura 29 – Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas. _____	76
Figura 30 - Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas. _____	76
Figura 31 - Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas. _____	77
Figura 32 - Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas. _____	77
Figura 33 – Gráfico de gradiente de pH. O gradiente de pH apresentado nesta figura é válido para condições próximas de 20°C em 8M ureia, usando IPGbuffer 3-10 NL. (Immobiline DrySrip gels Data file, 18-1177-60 AB, 2004-06; GE-Healthcare). _____	82

#### IV. Índice de Quadros

Tabela 1 – Valores individuais dos níveis plasmáticos de leptina (ng/dL). _____	38
Tabela 2 – Bandas diferencialmente expressas entre grupos [% de volume (média ± erro padrão)]. _____	43
Tabela 3 – Spots diferencialmente expressos entre grupos [% de volume (média ± erro padrão)] _____	45
Tabela 4 – Valores obtidos para o consumo de ração (g) nos 4 dias antes e nos 6 dias depois da indução da hiperleptinemia. _____	58
Tabela 5 - Valores obtidos para a evolução do peso nos 4 dias antes e nos 6 dias depois da indução da hiperleptinemia. _____	59
Tabela 6 - Valores obtidos para o consumo de ração em função da evolução do peso nos 4 dias antes e nos 6 dias depois da indução da hiperleptinemia. _____	60
Tabela 7 – Valores obtidos para a concentração de proteína nos diferentes grupos. ____	70
Tabela 8 – valores obtidos para a taxa de secreção de saliva (µg/ml)._____	70
Tabela 9 - Expressão para cada banda individual de cada animal, dentro de cada grupo	

83

## V. Abreviaturas e Acrónimos

POMC – proopiomelanocortina

NPY – neuropéptido y

$\alpha$ -MSH – hormona estimulante de  $\alpha$ -melanócitos

CART – transcrito do recetor da cocaína e anfetamina

AgRP – peptídeo agouti

Ob-R – recetor da leptina

CRH – hormona libertadora de corticotrofina

SNC – sistema nervoso central

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

Na<sup>+</sup> - ião sódio

Cl<sup>-</sup> - ião cloro

PPR – proteínas ricas em prolina

ARC – núcleo arqueado

PVN – núcleo paraventricular

MC4-R – recetor melanocortina-4

IgA – imunoglobulina A

2D – eletroforese bidimensional

MS – espetrometria de massa

ELISA – ensaio de imunodetecção do inglês enzyme-linked immunosorbent assay

PBS – tampão fosfato salino

FELASA – federação das associações europeias de ciências em animais de laboratório  
do inglês federation of european laboratory animal science associations

QC1 e QC2 – controlo de qualidade 1 e 2

HCl – ácido clorídrico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

SDS – dodecil sulfato de sódio

MW – massa molecular

DTT – Ditioneitol

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

## VI. Resumo – Efeitos da Hiperleptinemia na Secreção de Proteínas Salivares

Apesar da forte contribuição do sistema nervoso autônomo para a salivação, a influência de fatores hormonais não é de excluir.

Alterações salivares em função do apetite/saciedade foram sugeridas por outros autores. Sendo a leptina uma hormona supressora de apetite, cuja presença de recetores nas glândulas salivares foi observada, o objetivo do presente trabalho é avaliar se aumentos nos níveis circulantes da mesma influenciam a salivação.

Nos primeiros 3 dias de administração subcutânea de leptina observou-se uma diminuição do consumo de alimento, a qual deixou de se observar a partir daí e até ao fim dos 7 dias de ensaio. Apesar da concentração proteica e da taxa de secreção salivar se manterem semelhantes, foram observadas diferenças nos perfis proteicos salivares uni- e bi-dimensionais. Dos 15 *spots* proteicos diferencialmente expressos, um dos diminuídos situa-se numa zona anteriormente identificada como respeitante à amilase.

Assim, a hiperleptinemia induz alterações no perfil proteico salivar.

**Palavras – Chave: Hiperleptinemia, Leptina, Saliva, Proteínas Salivares**

## VII. Abstract – Effects of hyperleptinemia in the secretion of proteins Salivary

Despite the strong contribution of the autonomic nervous system to salivation, the influence of hormonal factors is not excluded.

Changes in salivary function of appetite / satiety were suggested by other authors. Being one suppressing hormone leptin in appetite, whose presence of receptors in the salivary glands was observed, the aim of this study is to assess whether increases in circulating levels of the same influence salivation.

In the first 3 days of subcutaneous administration of leptin was observed a decrease in food intake, which ceased to be observed thereafter until the end of the 7 days of testing. Although the protein concentration and the rate of salivary secretion remain similar, differences were observed in salivary protein profiles uni - and bi - dimensional. Of the 15 differentially expressed protein spots, one of diminished located in an area previously identified as relating amylase.

Thus, hyperleptinemia induces changes in salivary protein profile.

**Key - Words: Hyperleptinemia, Leptin, Saliva, Salivary Proteins**

## VIII. Fundamentos Teóricos

### A. Leptina

A palavra leptina vem do grego *lepto*, que significa 'fino'. É uma proteína de 167 - aminoácidos com um peso molecular de 16 kDa, secretada principalmente pelo tecido adiposo e, em menor escala, por outros órgãos como a medula óssea, placenta, estômago e tecido hipotalâmico (Campfield, 1998; Cinti, 2000). É composta por quatro hélices  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  curtas que contêm uma ponte de dissulfureto intra - cadeia responsável pela sua atividade biológica (Zhang et al., 1997).

A concentração plasmática de leptina é proporcional ao volume de células adiposas e aumentam em proporção à elevação da percentagem de gordura corporal (Considine et al., 1996). Estas concentrações estão aumentadas na maior parte dos indivíduos obesos (Naggert, 1997). Entre outras ações, a leptina ativa recetores hipotalâmicos, inibindo a secreção do neuropéptido Y (NPY), diminuindo o apetite e aumentando a termogénese pela ativação do sistema nervoso simpático (Chen e Campfield, 1996 1995) (Figura 1).

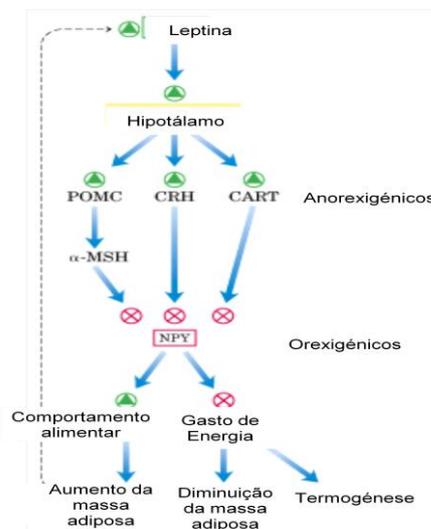


Figura 1 – Comportamento dos neurotransmissores mediante a ação da leptina. (adaptado de Nelson e Cox, 2000)

(POMC – proopiomelanocortina, CRH – hormona libertadora de corticotrofina, CART – transcrito do recetor da cocaína e anfetamina,  $\alpha$ -MSH – hormona estimulante de alfa-melanócitos, NPY – neuropéptido Y).

A descoberta da leptina, deixou claro que o tecido adiposo participa ativamente no controlo do dispêndio energético e do apetite. (Rumantir, 1999). Uma mutação no gene da leptina causa obesidade severa em roedores o que sugere que a função fisiológica

desta hormona seja o de evitar uma acumulação de gordura devido a um consumo excessivo de alimento, como proposto por *Frederich et al. (1995a)*.

A leptina produzida, na proporção de gordura armazenada informa o sistema nervoso central (SNC) da existência de um excesso de energia no corpo, suprimindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto de energia (*Fig. 2b*). Para além da quantidade de adipócitos, a expressão de leptina é controlada por diversas substâncias, nomeadamente insulina, glucocorticoides e citocinas pró-inflamatórias.

Em estudos com roedores, a obesidade tem sido associada a um estado de resistência à ação de leptina, caracterizado por uma falha de efeitos anorexigénicos e de aumento de dispêndio energético que deveriam estar associados aos níveis elevados de leptina circulante (*Fig. 2a*) (*Scarpace e Zhang, 2009*). Este estado tem sido associado a uma incapacidade da leptina para atingir os seus locais alvo no cérebro e / ou a uma redução do recetor da leptina (*ob-Rb*) na cascata de sinalização (*Cuppler, 2003*).

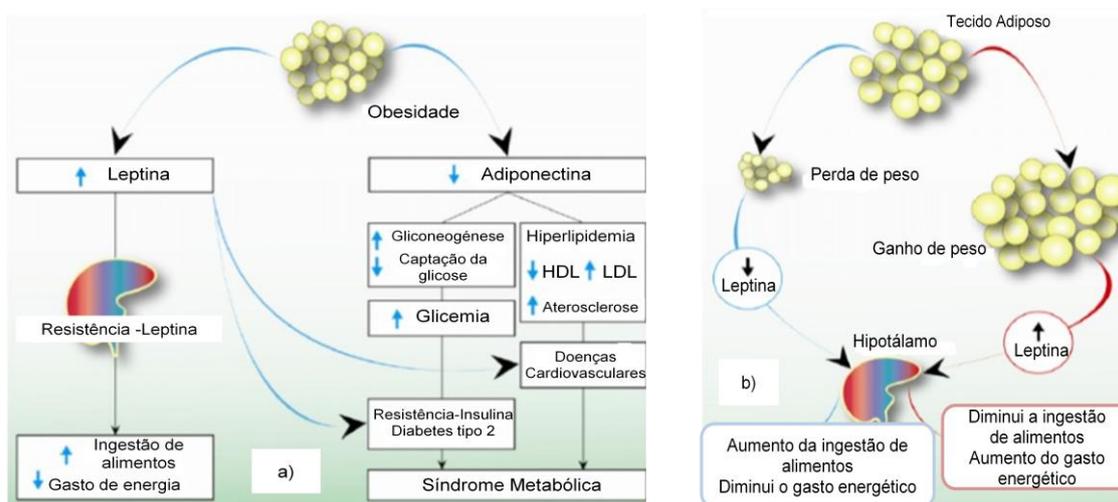


Figura 2 – (a) Resistência da leptina, e implicação desta e da adiponectina na síndrome metabólica da obesidade; (b) Biologia da leptina. (adaptado de Ricci, 2012)

### a) O recetor da Leptina

A leptina interage diretamente com o recetor de leptina (Ob-R), sendo este um membro da família dos recetores de citocinas, codificado pelo gene *db* (*Tartaglia et al., 1995*). A sequência de OB-R inclui dois domínios de ligação ao ligando. Existe em várias isoformas, devido ao *splicing* alternativo e cada isoforma tem um grande domínio extracelular, um domínio transmembranar e um domínio intracelular variável (*Tartaglia et al., 1995*). Apesar de terem sido identificadas seis isoformas do recetor (de a a f), até agora apenas duas são conhecidas como estando ligadas a vias de sinalização

intracelular e apenas uma (forma longa – Ob-Rb) apresenta uma capacidade de sinalização completa (*Laura and Eric, Chapter 2, Leptin receptors*). A região extracelular do recetor funciona como ligando para a leptina. Após ligação, desencadeia-se uma cascata de sinalização que se inicia com a ativação da proteína cinase JAK2, associada ao recetor, e a consequente fosforilação de dois resíduos de tirosina específicos, presentes na porção intracelular do recetor. Esta ativação, por sua vez ativa numerosos sinais intracelulares, os quais estão associados a uma variedade de ações biológicas em tecidos diferentes (*Laura and Eric, Chapter 2, Leptin receptors*). A isoforma de menores dimensões (Ob-Re) não é realmente um recetor, mas sim uma proteína de ligação solúvel, uma vez que a mesma não apresenta domínios transmembranar ou citoplasmático, estando presente em circulação em várias espécies (*Laura and Eric, Chapter 2, Leptin receptors*)

Foi referida a possibilidade de mutações do recetor de leptina resultarem em obesidade. Considine e colaboradores (*Considine et al., 1996*) examinaram a expressão do gene Ob-R no hipotálamo de cadáveres humanos magros e obesos e não observaram diferença na quantidade de OB-R mRNA entre os grupos. Isto sugere que a resistência à leptina observado em humanos obesos não é necessariamente devido a um defeito na quantidade de recetor de leptina, mas, pode ser devido a defeitos de uma das isoformas da Ob-R ou em uma das vias específicas ativadas pelas isoformas.

#### b) Mediação da Leptina

Os efeitos de saciedade, produzidos pela leptina são iniciados pela ativação dos recetores Ob-Rb, que se encontram expressos em maior quantidade no núcleo arqueado do hipotálamo. Nesta região do sistema nervoso central encontram-se dois grandes grupos de neuropéptidos – orexigénicos, neurónios estimuladores de apetite, [neuropéptido Y (NPY) e o peptídeo Agouti (AgRP)] e anorexigénicos, neurónios supressores de apetite, [proopiomelanocortina (POMC) e transcrito do recetor da cocaína e anfetamina (CART)] – os quais estão envolvidos na regulação da ingestão. Os primeiros induzem apetite, enquanto os segundos induzem saciedade. Quando as concentrações plasmáticas de leptina se elevam, há um aumento da expressão dos neuropéptidos anorexigénicos, nomeadamente POMC e CART (*Speakman, 2004*). A ativação dos neurónios que expressam POMC promove a síntese da hormona estimulante de  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH), a qual se liga aos recetores de melanocortina, diminuindo a ingestão alimentar. Por outro lado, há uma diminuição dos níveis de NPY/AgRP (*Yokosuka et al., 1998; Schwartz et al., 1997*). Assim, níveis elevados de leptina conduzem a uma diminuição de ingestão e a um aumento da ativação do sistema

nervoso simpático, com conseqüente aumento de gasto energético (Figura 3) (Speakman, 2004).

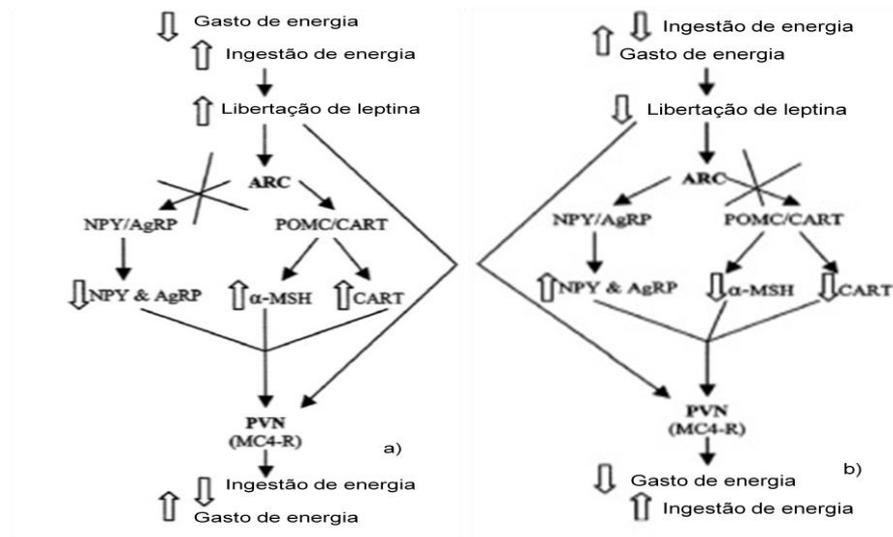


Figura 3 – (a) Esquema representativo do efeito crescente da leptina no hipotálamo; (b) Esquema representativo do efeito contrário. (adaptado de Allison et al., 2006).

(ARC – núcleo arqueado, NPY – neuropeptídeo Y / AgRP – peptídeo agouti, POMC – proopiomelanocortina / CART – transcrito do receptor da cocaína e anfetamina,  $\alpha$ -MSH – hormona estimulante de alfa-melanócitos, PVN – núcleo paraventricular, MC4-R – receptor melanocortina-4)

Ocorre o inverso quando há níveis baixos de leptina. Neste caso, os neurónios produtores de NPY/AgRP são estimulados, e os de POMC/CART são inibidos (Speakman, 2004). Isto leva a uma redução da atividade simpática, redução do dispêndio de energia e estimula a ingestão de alimento (Speakman, 2004).

A leptina, conseqüentemente, influencia diretamente a regulação a longo prazo do comportamento alimentar.

Para além de uma ação a nível do sistema nervoso central, a leptina parece atuar também a nível de outros órgãos. Por exemplo, no trato intestinal do rato (Harpal et al., 2003) e o recetor de leptina a nível da mucosa gástrica (Morton, et al., 1998; Breidert et al., 1999), tendo sido sugerido um papel desta hormona na integridade da mucosa e proteção gástrica (Schneider et al., 2001).

A leptina foi identificada na saliva, embora o seu papel neste fluido ainda não tenha sido completamente percebido (Groschl et al., 2001).

## B. Saliva

Nos últimos 50 anos, o ritmo da pesquisa salivar acelerou com o advento de novas técnicas que permitiram evidenciar as propriedades bioquímicas e físico-químicas

da saliva, as quais resultam numa diversidade de funções da saliva, nomeadamente na facilitação da fala, lubrificação, digestão dos alimentos e manutenção da saúde bucal e geral (Mandel, 1993).

O interesse na saliva aumentou ainda mais com a constatação de que a saliva contém componentes que podem servir como biomarcadores de diversas doenças, ou estados fisiológicos, de uma forma não-invasiva. A utilização de novas abordagens que incluem a genómica, proteómica, metabolómica, e bioinformática tem permitido aumentar o conhecimento relativamente a este fluido

Os termos "saliva total", "saliva mista" e "fluido oral" são usados para descrever os fluidos combinados presentes na cavidade oral. Esta saliva total é constituída pelas secreções das diversas glândulas salivares em conjunto com fluido gengival, microrganismos e células resultantes de escamação do epitélio (Mese et al., 2007).

A quantidade e composição da saliva humana secretada dependem de muitos fatores, ou seja, a taxa de fluxo, o ritmo circadiano (Dawes, 1972; Ferguson et al., 1973; Ferguson e Botchway, 1980; Castagnola et al., 2002), tipo e tamanho da(s) glândula(s) salivar(es) (Gusman et al., 2004; Veerman et al., 1996), duração e tipo de estímulo, alimentação, medicamentos, idade, sexo e tipo de sangue (Mandel 1974; Shannon et al., 1974) e estado fisiológico (Battino et al., 2002). Os estímulos para o aumento da salivação incluem a presença de alimentos ou substâncias irritantes na boca, e a visão ou o cheiro de comida (Christensen et al., 1984). Sendo a saliva um fluido que varia com os fatores descritos anteriormente a padronização da sua recolha é importante quando esta é usada como material de pesquisa.

### c) Composição Salivar

A saliva é uma solução complexa de iões e proteínas que contribuem para a manutenção da saúde oral, na digestão e também na perceção gustativa. Contém também as bactérias e os detritos da via oral. A saliva é estéril quando deixa as glândulas salivares, mas deixa de ser assim quando se mistura com o fluido crevicular, restos de comida, microrganismos e células mucosas orais descamadas (Sreebny, 1987). A saliva compreende 99% de água e o restante 1% é composto por moléculas orgânicas e inorgânicas. Parece, porém, que durante a estimulação oral, pelo gosto ou textura, como ocorre durante a mastigação de alimentos, a saliva das glândulas parótidas torna-se o principal contribuinte volumétrico para toda a saliva, aumentando a sua participação. Durante a ingestão, a proporção de saliva parótida em toda a saliva pode aumentar de 0% a mais de 50% (Humphrey e Williamson 2001)

Alguns autores demonstraram que não existe correlação entre o fluxo, a concentração (Kelsay et al., 1972) de proteína e outros. A saliva é um bom indicador dos

níveis plasmáticos de várias substâncias, tais como hormonas e fármacos, e pode, portanto, ser utilizado como um método não invasivo para monitorizar as concentrações plasmáticas de medicamentos ou outras substâncias (*Hofman 2001; Llana-Puy, 2006*).

A saliva contém enzimas digestivas (amilase e lipase) que iniciam a digestão do amido e dos lípidos, respetivamente, e que por sua vez, podem influenciar a perceção do gosto. Os fatores de crescimento presentes na saliva promovem o crescimento do tecido, a diferenciação, e cicatrização de feridas (*Jonsson et al., 1993*). A saliva contém também vários agentes anti-sépticos, anti-virais e anti-fúngicos, que mantêm a flora bucal adequada e inibem a colonização bacteriana dos dentes e tecidos moles, através da modulação da adesão de microrganismos (*Edgar, 1992; Melvin, 1991*).

A saliva é segregada maioritariamente pelos três pares de glândulas principais: parótidas (20%), submandibulares (65-70%) e sublinguais (7-8%). Estas glândulas são responsáveis pela produção de aproximadamente 90% do volume total de saliva sendo o restante (<10%) produzido principalmente por uma série de glândulas salivares menores, dispersas pela mucosa oral (*Greabu et al., 2009*). Este líquido é constituído principalmente por água (99,5 %), proteínas (0,3 %) e substâncias inorgânicas (0,2 %) (*Nieuw et al., 2004; Zalewska et al., 2000; Humphrey et al., 2001*).

#### *Constituintes inorgânicos da saliva*

Embora a secreção principal seja um ultrafiltrado do plasma (isto é, isotónica relativamente ao plasma), a reabsorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  no sistema ductal resulta numa secreção marcadamente hipotónica.

O bicarbonato, presente neste fluido, confere-lhe a capacidade de ter efeito tampão, enquanto o cálcio e o fosfato permitem a manutenção da integridade mineral dos dentes. É interessante notar que o pH e a composição iónica podem também influenciar a atividade de componentes orgânicos na saliva. Por exemplo, a atividade de enzimas salivares é influenciada por eletrólitos e iões salivares (*Mandel, 1989*).

#### *Constituintes orgânicos da saliva*

A saliva contém uma grande variedade de proteínas que são exclusivas para este fluido e que têm funções biológicas de especial importância, como já foi referido anteriormente. Por exemplo, a  $\alpha$ -amilase salivar que participa na digestão, ou um conjunto de proteínas que contêm níveis elevados de prolina (35-40%), e são por isso, designadas proteínas ricas em prolina (PPR).

As PRPs que compreendem cerca de 70% do conteúdo total de proteínas da saliva da parótida humana, são divididos em três grupos com base na carga e grau de glicosilação: ácidos, básicos e PRPs básicos glicosiladas (*Kauffman e Keller 1979*).

Uma vez que a amílase compreende a maior parte do resto do conteúdo total de proteínas da saliva da parótida, as outras proteínas (tais como a lisozima, lactoferrina, peroxidase, e IgA secretora) que tenham recebido maior atenção em tentativas de ligações entre a saliva e a saúde oral são, de facto, os componentes relativamente menores. As PPRs ligam taninos na dieta, e a sua expressão em roedores é drasticamente aumentada pela ingestão de taninos (Ann e Lin, 1997).

Outra proteína, staterina, permite a saliva manter o seu estado de sobressaturação no que diz respeito aos sais de cálcio e de fosfato (Hay et al., 1984).

As mucinas, o principal componente orgânico de saliva submandibular/sublingual, são grandes glicoproteínas que consistem em dois grupos principais, arbitrariamente definidos como MG1 (10-30 MDa) e MG2 (130-150 kDa). Outras proteínas anti - microbianas de saliva incluem a lisozima, lactoferrina, peroxidases e IgA.

#### d) Glândulas Salivares

As glândulas salivares são componentes vitais da cavidade oral, alterações nas suas funções podem provocar graves perturbações no nosso estilo de vida (Tucker e Miletich, 2010). Há três pares de grandes glândulas multicelulares (designadas no seu conjunto por glândulas salivares maiores): as parótidas, as submandibulares e as sublinguais (Figura 6).

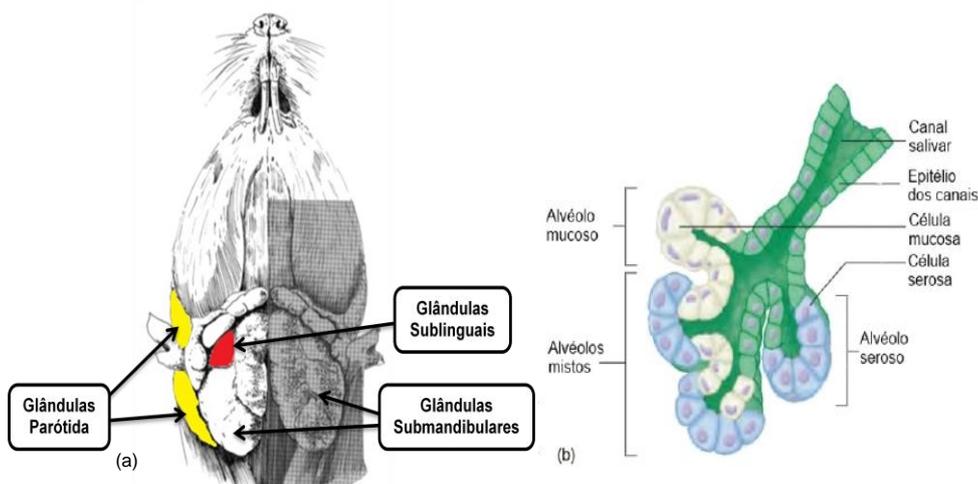


Figura 4 – (a) Localização das glândulas salivares principais; (b) Representação esquemática genérica de uma glândula salivar principal . (adaptado de seeley et al., 2007)

Para além destes grandes agregados de tecido glandular, existem muitas glândulas tubulares enveladas localizadas abaixo do epitélio da língua (glândulas linguais), do palato (glândulas palatinas), região jugal (glândulas bucais) e lábios

(glândulas labiais), estas glândulas são referidas no seu conjunto como glândulas salivares menores.

Todas as glândulas salivares maiores são constituídas por ramificações, com cachos de alvéolos semelhantes a cachos de uvas (*Figura 4b*).

As maiores de todas são as glândulas parótidas, são glândulas serosas que produzem principalmente saliva aquosa e estão localizadas anteriormente ao ouvido de cada lado da cabeça. Cada canal parotídeo abre-se na margem anterior da glândula, atravessa a face lateral do músculo masséter e penetra o músculo bucinador, entrando na cavidade oral junto ao segundo molar superior (*Figura 4a*).

As glândulas submandibulares são mistas, com mais alvéolos serosos do que mucosos. Cada glândula pode ser detetada como uma massa mole ao longo do limite inferior da metade posterior da mandíbula. A partir de cada glândula abre-se um canal que atravessa anteriormente e em profundidade a mucosa do pavimento bucal, que se abre na boca, junto ao freio da língua (*Figura 4a*).

As glândulas sublinguais, as mais pequenas de todas as glândulas maiores, são mistas e apesar de terem alguns alvéolos serosos, são principalmente constituídas por alvéolos mucosos. Estão localizadas imediatamente abaixo da mucosa do pavimento bucal. Ao contrário das glândulas submandibulares e parótidas, estas não têm canais individuais bem definidos; abrem-se no pavimento da cavidade bucal através de 10 a 20 pequenos canais (*Seeley et al., 2007*).

As glândulas salivares sofrem alterações estruturais com a idade e isso reflete-se na quantidade da saliva produzida e no tipo de componentes segregados (*Field, 2003; Nagler, 2004; Nagler, 2005*). Isto tem uma implicação profunda na composição e funções da saliva produzida e, conseqüentemente, na saúde oral.

Por outro lado, o facto de conter componentes de diferentes fontes complica ainda mais a análise de toda a saliva por várias razões - em primeiro lugar, muitas vezes é difícil determinar quais os componentes que representam verdadeiros constituintes salivares e os que têm origem celular ou bacteriana; em segundo lugar, como resultado do metabolismo bacteriano, a composição da saliva vai mudar com o tempo; em terceiro lugar, a presença de resíduos celulares e, portanto, a turbidez pode interferir com diversas técnicas analíticas.

Estes problemas podem ser superados pelo pré-tratamento da saliva (por exemplo, centrifugação, para remover as bactérias e os restos celulares) ou para a recolha/armazenamento das amostras de saliva, a temperaturas que param o metabolismo.

### e) Estrutura das glândulas salivares e produção de saliva

As glândulas salivares, consistem basicamente numa porção de secreção e num sistema ductal (*Hand, 1980*). O sistema ductal é composto por epitélio ductal e é classificada em ductos intercalares, estriados e interlobulares de acordo com a morfologia. Funcionalmente e histologicamente, os ductos estriados assemelham-se aos túbulos renais distais dos rins (*Bradley, 1995*).

No caso específico de ratos e ratinhos, encontram-se ductos granulares entre os ductos intercalares estriados (*Gresik, 1994*), sendo notavelmente desenvolvidos em roedores machos (*Gresik, 1994; Chretien, 1977*). Os ductos granulares são tecidos dependentes de androgénio, ao contrário das glândulas salivares humanas, as glândulas salivares em roedores são considerados como distintamente órgãos dependentes de hormonas sexuais (*Amano e Iseki, 1998*).

Estímulos sensoriais, elétricos ou mecânicos podem modificar a taxa de secreção e a contribuição de cada glândula para o total de saliva.

O maior volume de saliva é produzido antes, durante e depois das refeições, atingindo um pico máximo em cerca de 3 horas, e caindo consideravelmente à noite durante o sono.

### C. Conceitos básicos de secreção de saliva

A secreção de saliva é geralmente aceite como sendo um processo de duas fases, com a secreção inicial de um tipo de plasma fluido primário aquoso pelas células acinares e a sua modificação subsequente, durante a passagem através do sistema celular ductal impermeável à água.

A secreção é principalmente controlada pelo sistema nervoso autónomo, nomeadamente pelos ramos simpático e parassimpático, através de sistemas de transdução de sinal. Os volumes de saliva produzida variam dependendo do tipo e da intensidade da estimulação, os maiores volumes ocorrem com a estimulação colinérgica ou parassimpática.

Os neurotransmissores libertados em resposta a estímulos de secreção ligam-se a recetores proteicos específicos na membrana da célula acinar. Recetores esses que são adrenérgicos, no caso de a estimulação ser simpática e colinérgicos, no caso de uma estimulação parassimpática. Isso causa uma cascata de sinalização intracelular, com os resultantes efeitos a nível de secreção de fluido, componentes orgânicos e inorgânicos.

No caso da estimulação colinérgica muscarínica, o sistema de transdução de sinal envolve a libertação de cálcio das reservas intracelulares de trifosfato de inositol (IP3) e a ativação subsequente de uma variedade de canais de iões e os sistemas de transporte,

levando ao movimento trans-epitelial de água (Martinez, 1990; Baum et al., 1993; Turner, 1993; Ambudkar, 2000).

## D. Aspectos bioquímicos da saliva

### f) Análise global das proteínas salivares

A saliva contém uma grande variedade de proteínas e péptidos que possuem importantes funções biológicas, tal como foi referido anteriormente. Para além disso, muitos dos componentes presentes em circulação encontram-se também na saliva. Isso, em conjunto com o fato deste ser um fluido de fácil acesso, sendo a sua recolha não invasiva fez com que o estudo da composição proteica da saliva ganhasse interesse nos últimos anos (Raymond et al., 2007).

Uma abordagem que tem vindo a ser usada para estudar a saliva é a análise global de proteínas salivares, utilizando técnicas de proteómica. O conhecimento do proteoma salivar não só melhorou o conhecimento da fisiologia oral, mas também tem vindo a permitir a identificação de novas proteínas e a avaliação de alterações nos níveis destes compostos orgânicos em diferentes condições fisiológicas ou estados patológicos (Raymond et al., 2007).

Diversos investigadores utilizaram a eletroforese bidimensional (2D) (figura 5) para separar a componente proteica, seguida por espectrometria de massa (MS) para identificar posteriormente essas proteínas de interesse (Ghafouri et al., 2003). Com esta abordagem mais de 1000 proteínas foram identificadas em toda a saliva.

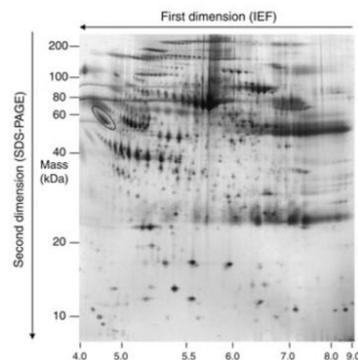


Figura 5 – Exemplo do resultado final de uma electroforese 2-D de saliva humana.

(<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n2/full/nprot.2006.104.html>)

## IX. Problemática

A leptina é uma hormona que é sintetizada e produzida principalmente pelos adipócitos e é identificada como um fator chave na manutenção do equilíbrio de energia e composição geral do peso corporal. A descoberta do gene associado com a obesidade, o gene *ob*, e a sua proteína, a leptina, forneceram a primeira evidência fisiológica de um sistema de regulação de controlo do peso do corpo (*Allison et al., 2006*).

As concentrações de leptina afetam o papel do hipotálamo, na modulação do estado energético do corpo. Elevadas concentrações de leptina, levam a uma diminuição do apetite, com aumento do dispêndio energético (balanço energético negativo), enquanto baixas concentrações têm um efeito contrario (saldo positivo).

A leptina é produzida, embora em níveis mais baixos em outros tecidos, tais como o epitélio gástrico, músculo-esquelético e a placenta (*Ahima e Osei, 2004*). Existem estudos que sugerem papéis fisiológicos da leptina nestes tecidos. Por exemplo, a expressão de leptina no estômago é estimulada pela alimentação, sugerindo assim um papel na regulação do balanço energético. A leptina que se encontra na placenta é estimulada pela hipoxia, elevada em eclâmpsia, podendo influenciar o resultado fetal (*Ahima e Osei, 2004*).

A síntese de leptina também foi referida no cérebro, o que sugere uma ação parácrina ou autócrina; no entanto, a relevância fisiológica da leptina que deriva do cérebro permanece por determinar (*Ahima e Osei, 2004*).

Apesar da secreção das glândulas salivares ser maioritariamente regulada pelo sistema nervoso autónomo, há cada vez mais evidências da influência de outros fatores nessa regulação, nomeadamente da ação hormonal (*Ekström e Cevik, 2008*).

Alguns estudos mostraram que, em várias espécies animais, existem recetores de leptina funcionais nas glândulas salivares (*Dall'Aglio et al., 2012*). Apesar de a sua função não estar completamente clarificada, esta presença sugere a possibilidade desta hormona influenciar a salivação. No entanto, que seja do nosso conhecimento, não há estudos em que se tenha avaliado a alteração da composição proteica da saliva induzida por hiperleptinemia.

## X. Objetivos

Com a realização deste trabalho, pretende-se contribuir para aumentar o conhecimento sobre a forma como os mecanismos que regulam a ingestão de alimentos poderão também estar envolvidos na regulação da secreção de proteínas da glândula salivar.

### E. Objetivo Geral

- ✓ O objetivo principal deste trabalho consiste em avaliar os efeitos das alterações na composição proteica da saliva induzidas por hiperleptinemia.

### F. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliação do efeito da leptina nos pesos vivos e no consumo de alimento;
- ✓ Avaliar alterações na taxa de salivação (estimulada) e na concentração proteica, induzidas por hiperleptinemia;
- ✓ Estudar as alterações no perfil proteico uni- e bi-dimensional induzidas por leptinemia.

## XI. Estratégia

### G. Plano Experimental do trabalho

#### 1) Realização do trabalho

Local – Laboratórios de Bioquímica da Universidade de Évora, Portugal.

Tempo de duração – 9 meses (ensaio com animais e análise laboratorial de amostras).

#### 2) Modelo e características dos animais

Modelo animal – Ratos Wistar

Idade – Adultos jovens, 11-12 semanas ao início do ensaio;

Critério de Seleção – género masculino.

Tipo de Alimentação – ração *standard* para roedores (SAFE 04)

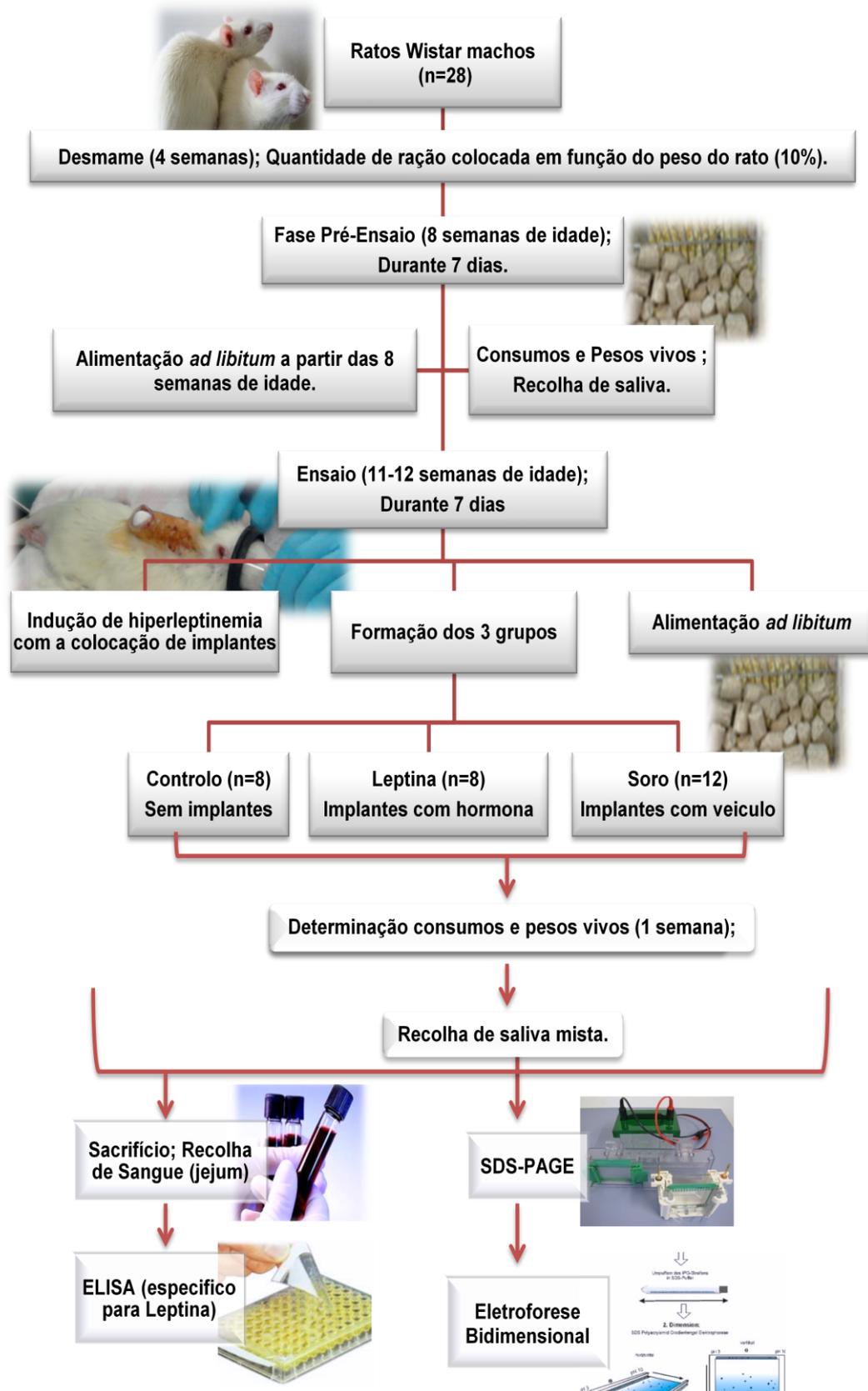
Tratamento – implantes subcutâneos de libertação contínua, contendo leptina em tampão fosfato salino.

#### 3) Amostra em estudo

Plasma, obtido a partir do sangue recolhido por punção cardíaca;

Saliva mista recolhida por aspiração após estimulação com um agonista dos recetores muscarínicos do subtipo M3 (pilocarpina).

## H. Organigrama



## XII. Materiais e Métodos

### I. Animais e dieta

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, com 11 a 12 semanas.

Durante o período experimental, os 28 animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com controlo de temperatura (24 °C) e fotoperíodo (12h:12h), com livre acesso à água e à ração (SAFE04). Nas 4 primeiras semanas após o desmame, os animais receberam ração numa quantidade correspondente a 10% do seu peso vivo. A partir daí a ração foi distribuída *ad libitum*. Foi usado material de “cama” apropriado para roedores (à base de carolo de milho). A limpeza das gaiolas e a substituição das camas foi efetuada uma vez por semana. Cada gaiola foi devidamente identificada com etiquetas, que continha os códigos dos animais. Foram colocados no interior das gaiolas tubos de papel, de modo a enriquecer o ambiente e proporcionar bem-estar.

Os pesos corporais e o consumo de alimento foram monitorizados diariamente, uma semana antes da colocação dos implantes e durante o período de permanência dos mesmos.

### J. Indução de hiperleptinemia em modelo animal

Foram constituídos três grupos experimentais:

- 1) Animais submetidos a hiperleptinemia (N=8);
- 2) Animais recebendo uma solução de tampão fosfato salino (PBS) (N=12);
- 3) Animais não intervencionados cirurgicamente (controlo) (N=8).

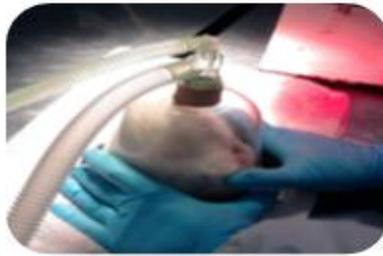
Os animais submetidos a hiperleptinemia foram submetidos a uma pequena cirurgia para colocação de implantes subcutâneos (mini-pumps osmóticas Alzet), contendo leptina em PBS. O mesmo procedimento foi utilizado para os outros animais, mas em que os implantes foram cheios apenas com a solução utilizada para preparar a solução de leptina (PBS), mas sem esta hormona.

Os implantes permaneceram durante um período de 7 dias, o qual constituiu o período de ensaio.

A dose de Leptina administrada foi de 0.2 µg/g peso vivo/dia, para cada rato.

Na noite anterior às intervenções cirúrgicas, os animais ficaram em jejum.

Para a colocação dos implantes os animais foram submetidos a anestesia volátil (isoflurano veiculado em oxigénio) como se pode verificar pela imagem seguinte (*figura 6*).



*Figura 6- Rato wistar submetido a anestesia geral.*

Com os animais mantidos sob o efeito da anestesia, foi-lhes rapado o pelo das costas junto ao pescoço (*figura 7*) e foi feita a antissepsia com betadine (*figura 8*), para se proceder a incisão longitudinal na pele no mesmo local (*figura 9*), de modo a minimizar o acesso do animal á mesma.



Figura 7



Figura 8



Figura 9

*Figura 7, 8 e 9 – Início do procedimento cirúrgico.*

Com a ajuda de uma tesoura foi “descolada” a pele do músculo (*figura 10,11*), de maneira a colocar o implante subcutâneo (*figura 12,13*), com a zona de saída da solução voltada para a cabeça.



Figura 10



Figura 11



Figura 12



Figura 13

*Figura 10, 11, 12 e 13 – Rato wistar durante o procedimento cirúrgico para colocação do implante.*

A incisão foi suturada com linha de nylon (*figura 14*) e foi-lhes administrado um antibiótico (enrofloxacina) (*figura 15*). A incisão suturada foi tratada com betadine (*figura 16*), duas vezes ao dia, sendo estes posteriormente monitorizados até se encontrarem estabilizados após todo este procedimento.



Figura 14



Figura 15



Figura 16

*Figura 14, 15 e 16 – Fim do procedimento cirúrgico.*

Os ratos do grupo “controlo” também foram transportados para a sala de cirurgia e manipulados de modo semelhante, desde o período de jejum, com exceção dos procedimentos cirúrgicos. O objetivo foi submetê-los às mesmas condições ambientais.

Todo o procedimento foi realizado em condições de assepsia.

Após os sete dias de indução de hiperleptinémia os animais pertencentes aos diferentes grupos foram anestesiados com éter e eutanasiados. O sangue foi recolhido por punção cardíaca, e colocado em tubos contendo EDTA. Os vários procedimentos que envolveram animais foram supervisionados por cientistas treinados pela FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) e em conformidade com a lei portuguesa (Portaria 1005/92) que segue a Regulamentação da União Europeia.

## K. Recolha de saliva mista

Foram feitas recolhas de saliva mista, em dia diferentes, no período posterior à colocação dos implantes. No período pós-colocação dos implantes as recolhas efetuaram-se aos 5º e 7º dias. Para as recolhas a salivação foi induzida através da administração um agente parassimpatomimético (pilocarpina) numa dose de 5mg/kg peso vivo. As recolhas foram feitas sempre à mesma hora do dia e nas mesmas condições, para minimizar diferenças na composição devido a fatores externos. A saliva foi recolhida por aspiração direta da boca, com uma micropipeta, durante um período fixo de 10 minutos após o animal iniciar a salivação.

A saliva recolhida foi colocada em tubos mantidos em gelo, tarados, os quais foram pesados no final dos 10 minutos de recolha de modo a estimar o volume recolhido e, conseqüentemente, a taxa de secreção. As amostras foram congeladas a -20°C até análise laboratorial. Posteriormente, e imediatamente antes da realização de análises, foram centrifugadas a 14000 g durante 15 minutos, a 4°C, para se obter uma amostra homogénea, com baixa concentração de mucinas, células e restos de alimentos.

## L. Determinação dos níveis de Leptina circulantes

Os níveis plasmáticos de leptina foram quantificados através do método ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent Assay), em que foi utilizado um kit da Milipore (EZRL-83K). A amostra de sangue recolhida na altura da eutanásia, e mantida em tubos com EDTA, foi centrifugada a 3000 rpm, durante 15 minutos á temperatura ambiente, procedendo-se assim á recolha de plasma.

Este método baseia-se na ligação da leptina presente na amostra por um anticorpo-imobilizado nos poços da placa de microtitulação. Após incubação da amostra com o anticorpo primário, durante 2 horas á temperatura ambiente, com agitação, ocorre a lavagem com tampão tris salino contendo tween-20 (10x concentrado; 50 mM), de modo a remover material não ligado.

Em seguida há a adição de um anticorpo de deteção biotinilado purificado (anticorpo secundário), que se liga ao anticorpo primário immobilizado. Após passo de lavagem, com tampão de lavagem, adiciona-se enzima peroxidase que se liga ao anticorpo secundário, apresentando-se um desenvolvimento de coloração pela atividade da enzima na presença do substrato (3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina).

De acordo com as recomendações do fabricante, a atividade enzimática é medida espectrofotometricamente pela absorção aumentada a 450nm, corrigido a partir da absorção a 590nm, após acidificação dos produtos formados. No nosso caso, e devido à ausência de filtro para leitura a um comprimento de onda de 590nm, as leituras foram

feitas a 450 e 630nm. O aumento da capacidade de absorção é diretamente proporcional à quantidade de leptina capturada, presente nas amostras. Os valores de leptina presente nas amostras em estudo foram calculados através de interpolação de uma curva de referência gerada pela utilização de soluções de concentrações conhecidas (padrões de referência), aplicadas na mesma placa. Na mesma placa em que se aplicaram as soluções para traçar a curva e as amostras, foram aplicadas também duas soluções como controlos de qualidade (QC1 = 2,4 ng/mL e QC2 = 9,2 ng/mL), para avaliação da qualidade dos resultados. Todas as soluções (incluindo padrões e controlos de qualidade; 10 µL) foram aplicadas em duplicado (10 µL em cada poço).

Foi utilizada uma solução ácida (HCl 1M) para parar a reação quando se começou a desenvolver cor.

Uma vez que o kit utilizado se destinava à quantificação de leptina em soro de rato e as nossas amostras eram de plasma, foi adicionado a cada amostra 10 µl de solução matriz constante no kit, conforme condições do fabricante.

## M. Estudo Proteómico da Saliva

### g) Quantificação da proteína total pelo método Bradford

As amostras de saliva mista individuais (amostras depois da cirurgia) foram descongeladas e a concentração proteica determinada pelo método de Bradford. Este método baseia-se na quantificação da concentração proteica através da ligação do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 às proteínas em meio ácido, a qual conduz à passagem de uma cor avermelhada (do corante), para uma cor azulada. Os valores de absorvência a 595 nm são proporcionais à quantidade de proteína ligada. No presente trabalho, as leituras foram feitas para um comprimento de onda de 630 nm, para ser aquele disponível, onde se verifica absorção.

Foi feita uma curva padrão de BSA (50, 100, 200, 250 e 350 µg/mL). Numa placa de 96 poços colocaram-se em triplicado 10 µL de amostra ou padrão, aos quais se adicionaram 200 µL do reagente de Bradford. Tendo em conta a gama de concentrações proteicas possíveis para a saliva mista de ratos, para cada amostra, foram feitas diluições de 2x, 4x, 8x e 16x.

### h) Comparação dos perfis proteicos por eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a obtenção do perfil electroforético uni-dimensional, as proteínas foram separadas por eletroforese dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida (SDS-

PAGE). O princípio do método baseia-se na utilização do sistema tampão de Laemmli, o qual é um sistema descontínuo de tamponamento que incorpora SDS no tampão. Neste sistema, as proteínas são desnaturadas por ação do calor, num tampão contendo SDS (detergente aniônico) e um agente redutor tiólico tal como o  $\beta$ -mercaptoetanol ou o ditiotretol. O detergente SDS é usado para desnaturar proteínas com varias subunidades e para cobrir as moléculas da proteína com cargas negativas. Deste modo, a carga intrínseca a proteína é mascarada, e a razão carga/massa torna-se constante. Assim, quando expostas a um campo elétrico, as proteínas são separadas em função da sua massa molecular (MW).

#### *Preparação das amostras*

Foi calculado o volume de amostra a aplicar em cada poço, de forma que a quantidade de proteína fosse a mesma para cada amostra (7,5  $\mu$ g). Cada amostra foi misturada com tampão de amostra (0,125M Tris-HCL, pH 6,8, SDS 1% (m/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 20% (v/v) e uma quantidade vestigial de azul de bromofenol) e incubada durante 5 minutos a 95°C, tempo apos o qual foi colocado em gelo até aplicação no gel.

Cada amostra foi aplicada num poço de géis de poliacrilamida (8 x 10 cm e 1 mm de espessura) (sistema Protean mini da Bio – Rad), com as seguintes características: gel de resolução 12% (T/C), [5mL de Tris-HCL 1,5M, pH 8,8, 200 $\mu$ L de SDS, 8 mL de acrilamida / bis 30% (m/v), 6,8mL de água bi-destilada, 150 $\mu$ L de Persulfato de amónio (PSA), 0,1g/mL e 10 $\mu$ L de TEMED]; gel de concentração 4% (T/C) [2 mL de Tris-HCL 0,5M, pH 6,8, 80 $\mu$ L de SDS, 4,86 mL de água bi-destilada, 1,06 mL de acrilamida / bis 30%, 4,8 $\mu$ L de PSA e 8,8 $\mu$ L de TEMED].

#### i) Corrida Eletroforética

Em cada gel, num dos poços foi colocado um marcado de massas moleculares (Dual Color da Bio. Rad. Ref. 161-0324). A corrida eletroforética decorreu a uma voltagem constante de 140V até a frente de corrida atingir o fim do gel.

Os géis foram corados, por duas horas, com uma solução de azul brilhante de Coomassie R-250 [0,5% azul brilhante de Coomassie R-250; metanol 45% (v/v), e ácido acético 10% (v/v)], e descorados, através de diversas passagens por uma solução de metanol 20% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), até que as bandas ficassem bem visíveis. As imagens dos géis foram obtidas através de digitalização (ScnaJet 3400C HP). A análise das imagens foi feita com recurso ao software GelAnalyser (<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/productById/pt/GELifeSciences/28940830>). De modo a poder comparar amostras corridas em géis diferentes e a

minimizar erros devido a pequenas diferenças na quantidade de proteína aplicada em cada poço, foram calculadas as percentagens de volume de cada banda.

#### j) Comparação dos perfis proteicos por eletroforese bidimensional

Tendo em conta a necessidade de aplicar um volume de amostra inferior a 50  $\mu\text{L}$ , cada uma das amostras de saliva foi concentrada com recurso a membranas com um *cutoff* de 3 kDa (Nanosep 3K omega, PALL corporation), através de centrifugação a 13000  $g$  a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Para cada amostra, após concentração, um volume de amostra, correspondente a uma quantidade de proteína de 160  $\mu\text{g}$  foi incubado com tampão de re-hidratação (7M Ureia, 2M Thiourea, 4% (m/v) Chaps, 2% (v/v) IPG buffer e 20 mM DTT) (260  $\mu\text{L}$  volume total) à temperatura ambiente, durante 1h. Após este período esta mistura foi centrifugada, a 10 $^{\circ}\text{C}$ , a 10000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante (250  $\mu\text{L}$ ) foi aplicado num suporte apropriado, colocando-se uma tira de gel em contacto com este. Colocou-se óleo mineral, por cima, de modo a evitar evaporação da solução, tendo a re-hidratação ocorrido de forma passiva e *overnight*, à temperatura ambiente. De modo a minimizar a variabilidade nas condições de corrida, usaram-se tiras de gel pré-compradas, com gradiente de pH (IPG strips, 3-11 NL, GE healthcare). Posteriormente, cada uma das tiras re-hidratadas com a amostra foi submetida a focagem isoeletrica.

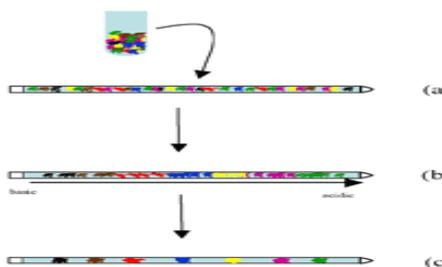


Figura 17 –Protocolo de 2D.

(a-c) - Demonstra o movimento de proteínas de um campo elétrico em um gradiente de pH. A proteína vai migrar para o ponto do gradiente onde o pH é igual ao seu pH.

([http://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/mass\\_spectrometry/proteomics/technologies/2d\\_page](http://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/mass_spectrometry/proteomics/technologies/2d_page))

A focagem isoeletrica ocorreu durante 19 horas, com o seguinte programa: passo 1 – subida para 150V (0:01h), passo 2 - 150V (1:00h), passo 3 – subida para 300V (0:30h), passo 4 – 300V (1:30h), passo 5 – subida para 3500V (4:00h), passo 6 – 3500V (6:00h).

Após separação das proteínas de acordo com o ponto isoeletrico, cada tira sofreu dois passos de equilíbrio de 15 minutos cada, com uma solução constituída por -50 mM Tris-HCL, 6M Ureia, 30% (v/v) Glicerol, 2% (m/v) SDS e 0,002% (m/v) azul de bromofenol. No primeiro passo foi adicionado DTT 20mM a esta solução (quebra as

ligações de pontes dissulfureto) e no segundo passo 2,5% (v/v) iodoacetamida (impede a formação de ligações entre resíduos de cisteína).

Apos o equilíbrio as tiras foram colocadas no topo de um gel SDS-PAGE 12% acrilamida (T/C) (20 cm X 20 cm X 1 mm) (sistema protean xi Bio-Rad) e as proteínas separadas de acordo com a sua massa molecular, a uma voltagem constante de 150 V.

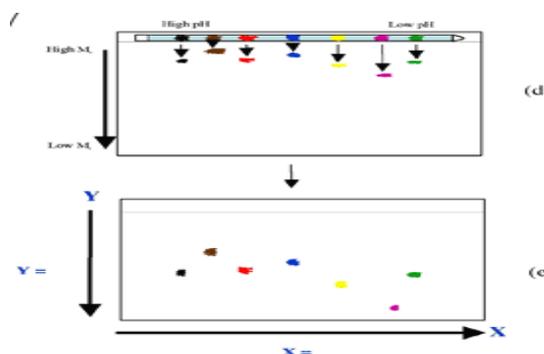


Figura 18 – Protocolo de 2D.

(d-e) – Demonstra a transferência das proteínas a partir da 1ª dimensão de para o gel de resolução e as separações de proteínas de acordo com o seu tamanho. ([http://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/mass\\_spectrometry/proteomics/technologies/2d\\_page](http://www.ucl.ac.uk/ich/services/lab-services/mass_spectrometry/proteomics/technologies/2d_page))

Os géis foram posteriormente corados com uma solução de Azul Brilhante de Coomassie R-250, conforme descrição feita anteriormente na secção acerca da comparação dos perfis proteicos por SDS-PAGE. Os géis obtidos foram digitalizados (Image Scanner, GE) e analisados com recurso a *software* apropriado (ImageMaster Platinum v 7.0, GE).

## N. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados através da aplicação estatística SPSS, PASW statistics 18. Inicialmente verifica-se se a distribuição é normal ou não, sendo assim, são utilizados testes paramétricos ou não paramétricos, respetivamente. Dentro dos paramétricos recorreu-se a ANOVA (one-way), nos não paramétricos utilizou-se o teste Kruskal-Wallis. Trabalhamos com dois intervalos de confiança, sendo o de 95% ( $p < 0,05$ ) e o de 90 % ( $p < 0,1$ ), dependendo dos parâmetros em análise.

### XIII. Resultados

#### O. Variação de Pesos e Consumos induzida por hiperleptinemia

Os pesos individuais e os consumos de alimento foram avaliados diariamente, de modo a avaliar o efeito da administração de leptina.

No que diz respeito aos pesos individuais, os grupos foram comparados em termos de pesos vivos diários e em termos de variação de peso. A variação de peso obteve-se pela diferença entre o peso vivo de um dia e o peso vivo do dia anterior.

Em relação ao peso vivo (*figura 19 e Anexo 1*), não se observam diferenças significativas entre grupos.

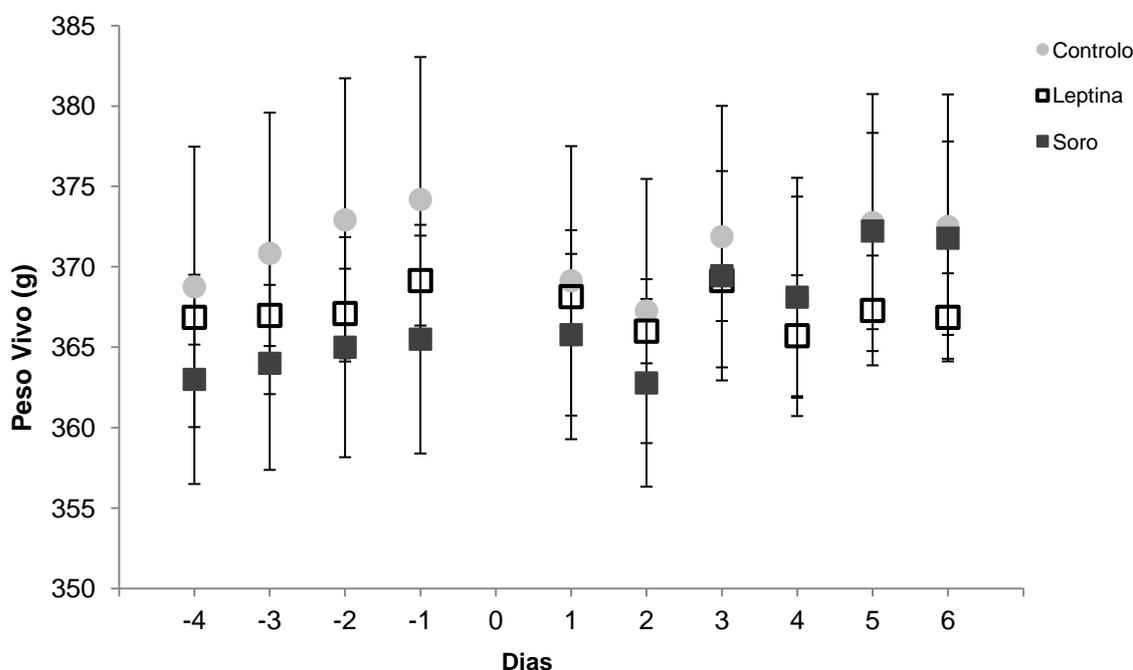


Figura 19 – Evolução do peso vivo (g) para os diferentes grupos, antes da cirurgia (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6)

Em termos de variação de peso (*figura 20 e Anexo 1*) não se observam diferenças significativas entre os grupos. No entanto, em termos médios, parece haver uma pequena tendência para ganhos inferiores a partir do dia 3 após a colocação dos implantes.

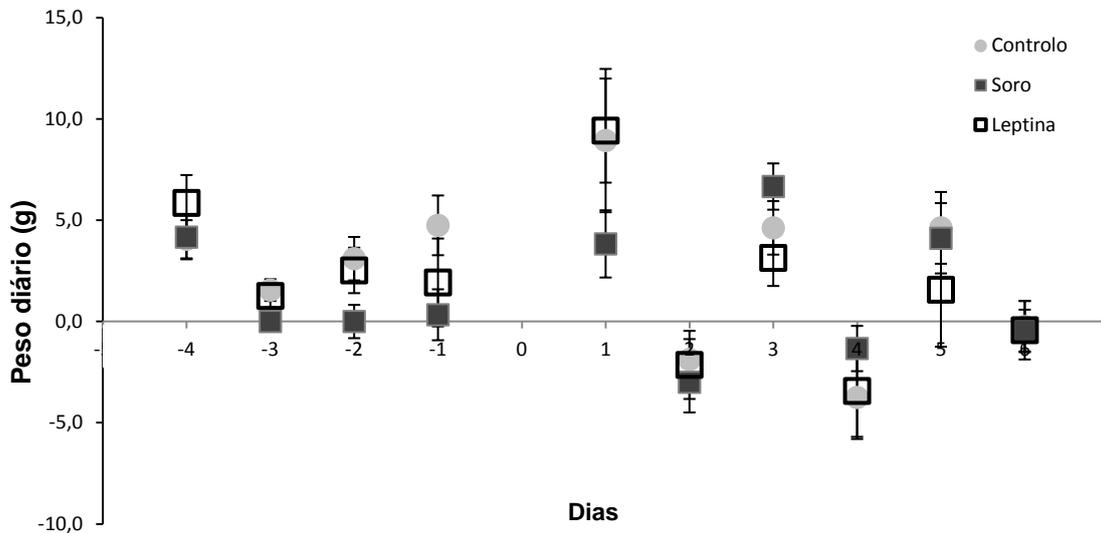


Figura 20 – Evolução do peso diário (g) para os diferentes grupos, antes da cirurgia (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6.).

No que diz respeito ao consumo de ração (figura 21 e Anexo 1), quando se considera a quantidade (g) de ração consumida diariamente, observa-se uma tendência para valores mais baixos no grupo da leptina, nos primeiros dias após colocação dos implantes. No entanto, a diferença entre estes últimos e os valores observados para os indivíduos que receberam soro, só é significativa ao 3º dia após o início da administração de leptina ( $32,39 \pm 0,78$  (soro),  $28,73 \pm 0,93$  (leptina)) A partir daí os valores de consumos de ração, para os animais tratados com leptina, aproximam-se dos valores dos restantes grupos experimentais.

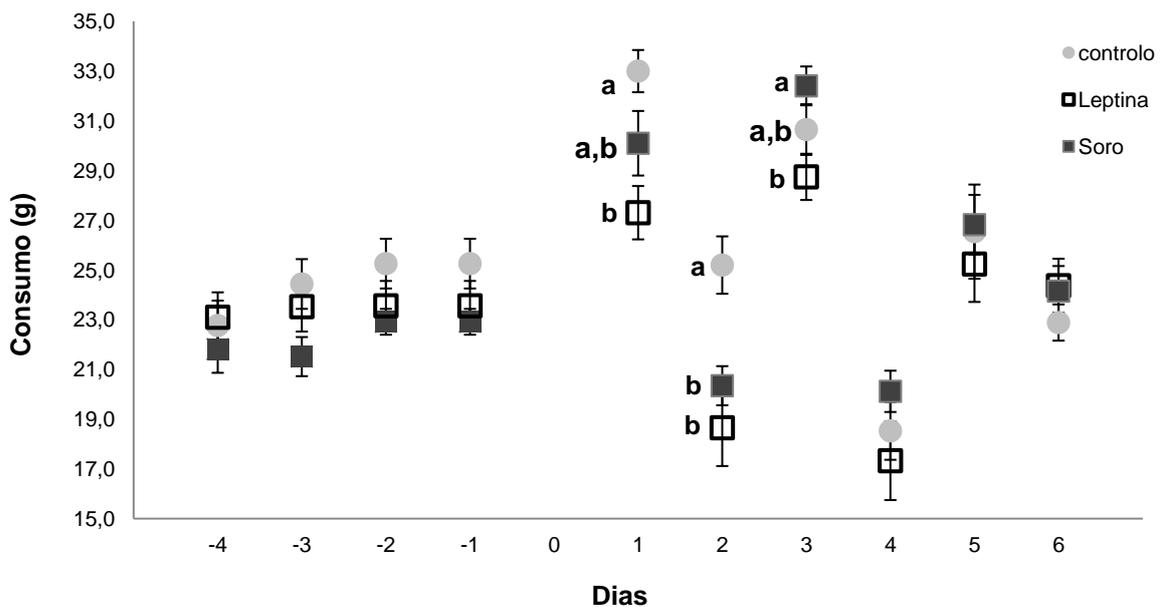


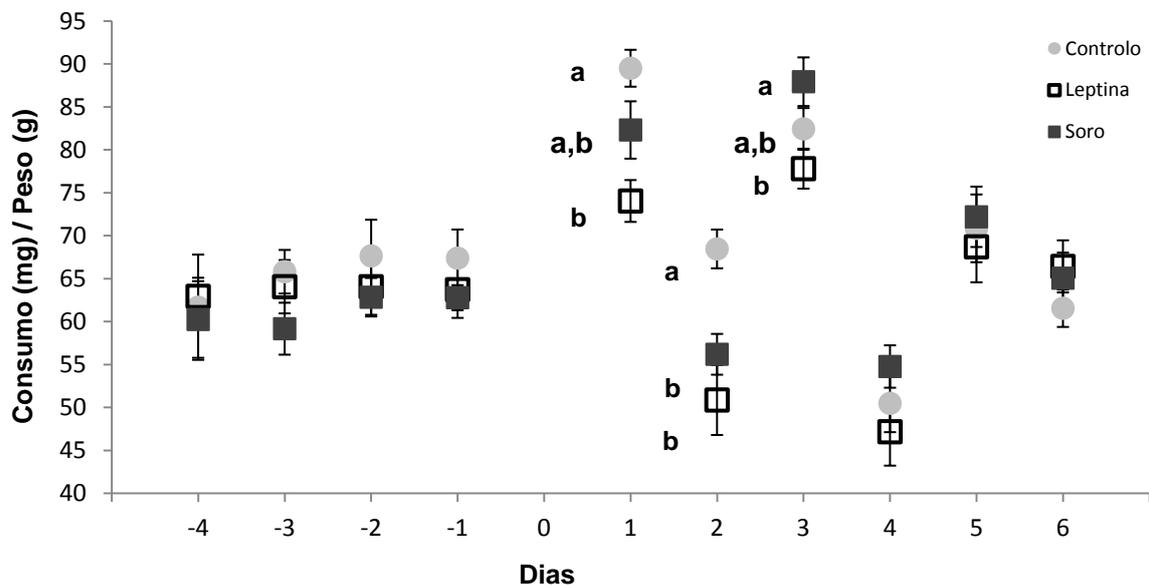
Figura 21 – Consumo de ração absoluto (g) para o antes (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6); Letras diferentes significam diferenças entre os grupos dentro do mesmo dia;  $p < 0,05$ ;

Esta diferença (ou tendência) não se observava antes do início do tratamento, onde os animais dos 3 grupos se comportavam de forma semelhante.

Nos primeiros dois dias, após colocação dos implantes, os animais que receberam leptina consumiram significativamente menos ração do que os animais do grupo controlo ( $32,99 \pm 0,85$  g (controlo),  $27,29 \pm 1,07$  g (leptina)) após a cirurgia. Uma situação semelhante foi observada para os indivíduos que receberam soro, sendo a diferença entre este último e o grupo controlo significativa apenas no segundo dia ( $25,19 \pm 1,15$  g (controlo),  $20,34 \pm 0,79$  g (Soro),  $18,65 \pm 1,54$  g (leptina)).

Tendo em conta alguma variabilidade inter-individual, em termos de peso vivo, foi feita uma análise do consumo de ração em função do peso vivo dos animais (mg alimento consumido/g PV) (*figura 22 e Anexo 1*).

Também, neste caso, se observa uma tendência para os animais do grupo que recebeu leptina apresentarem valores mais baixos que os animais que receberam soro, sendo também a diferença estatisticamente significativa apenas no terceiro dia ( $87,94 \pm 2,83$  mg/g PV (soro),  $77,82 \pm 2,32$  mg/g PV (leptina)) após o início da administração. No entanto, é visível que desde o primeiro dia que há uma tendência para um decréscimo nos consumos, o qual parece deixar de ser evidente a partir do 4<sup>o</sup> dia.



*Figura 22 – Consumo de ração absoluto (mg) em função do peso (g) antes (dias -4 a -1) e depois da cirurgia (dias 1 a 6); Letras diferentes significam diferenças entre os grupos dentro do mesmo dia;  $p < 0,05$ ; (dia 1 –  $89,51 \pm 2,15$  (controlo),  $74,05 \pm 2,44$  (leptina)); dia 2 –  $68,47 \pm 2,26$  (controlo),  $56,20 \pm 2,38$  (Soro),  $50,88 \pm 4,07$  (leptina); média  $\pm$  erro padrão).*

Nos gráficos apresentados na figura 21 e 22 observam-se oscilações diárias no consumo, sendo estas comuns aos três grupos em estudo. Este menor consumo de ração num dia, seguido de um consumo aumentado no dia seguinte, e de uma nova diminuição a seguir, deve-se ao facto de ter existido um jejum hídrico dia-sim dia-não para realização de ensaios de microestrutura da ingestão (ensaio exterior à presente tese). No entanto, os referidos jejuns hídricos não afetam as conclusões, uma vez que esse tratamento foi aplicado de igual forma aos três grupos em estudo, tendo os mesmos variando de igual forma relativamente ao consumo de ração.

## P. Níveis plasmáticos de leptina

Os níveis de leptina determinados através do método ELISA encontram-se apresentados na tabela 1.

Um dos animais pertencentes ao grupo da leptina (rato 6a) foi retirado de toda a análise estatística, devido a este apresentar um baixo nível plasmático de leptina (*tabela 1*).

*Tabela 1 – Valores individuais dos níveis plasmáticos de leptina (ng/dL).*

Animal	Leptina (ng/dL)
6a	75,39 <sup>§</sup>
6b	225,90
7	212,65
8	266,17
13	312,96
11	371,35
12	206,40
14	206,60

*§ - Individuo considerado outlier.*

Os resultados apresentados anteriormente, respeitantes aos pesos vivos e consumos alimentares já não tiveram em consideração este animal, o mesmo acontecendo com a análise da saliva, cujos resultados se seguem.

Os animais do grupo em que foram colocadas as bombas infusoras com leptina apresentaram, ao fim dos 7 dias de tratamento, níveis plasmáticos de leptina médios cerca de 4 vezes superiores aos níveis médios observados para os indivíduos com bombas infusoras com veículo (PBS) e cerca de 2,5 vezes superiores aos níveis dos animais controlo ( $99,5 \pm 32,3$  ng/dL;  $62,1 \pm 30,9$  ng/dL;  $257,4 \pm 87,28$  ng/dL; média  $\pm$  erro padrão para os grupos controlo, soro e leptina, respetivamente) (*figura 23*).

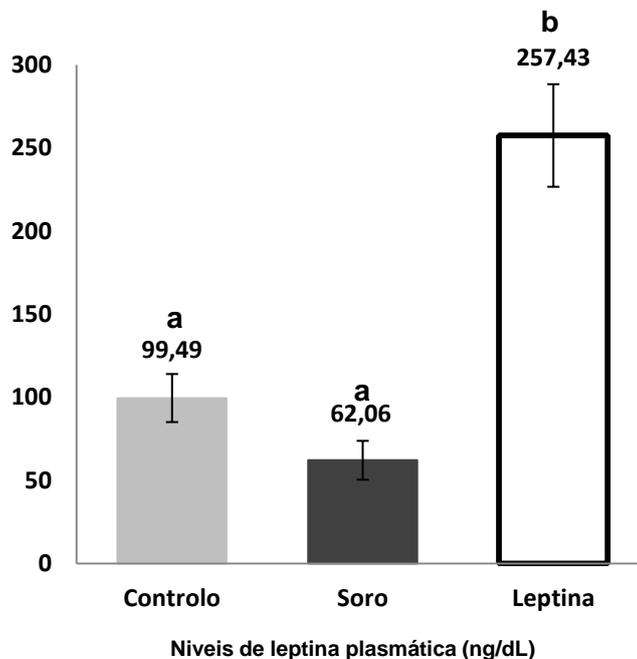


Figura 23 – Níveis de leptina plasmática para cada grupo (ng/dl) (média  $\pm$  erro padrão da média); a e b – letras diferentes significam diferenças entre grupos ( $p < 0,05$ ).

De acrescentar que os grupos controlo (indivíduos não submetidos a cirurgia) e soro (indivíduos com mini-pumps, que receberam o veículo) não diferiram entre si nos níveis de leptina.

#### Q. Efeito da hiperleptinemia na salivação

A salivação foi estimulada com uma solução de pilocarpina numa dose de 5 mg/kg peso vivo, antes e no final dos 7 dias de hiperleptinemia, sendo que este fármaco mimetiza a ação do sistema nervoso parassimpático.

Foi determinada a concentração de proteína total ( $\mu\text{g/mL}$ ) para cada amostra de saliva (figura 24A e Anexo 2).

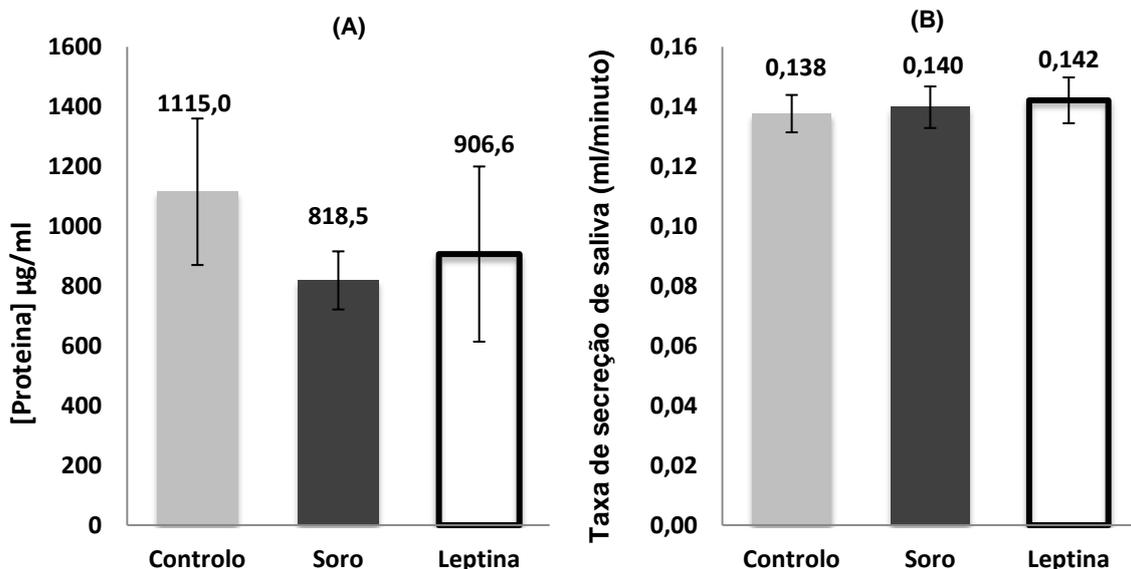


Figura 24 – (A) Concentração de proteína em cada grupo (média  $\pm$  erro padrão); (B) Taxa de secreção de saliva (média  $\pm$  erro padrão). Amostras recolhidas após a cirurgia.

Para a determinação da concentração de proteína, utilizou-se o método de Bradford. Pela análise estatística dos dados, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em estudo ( $p < 0,05$ ). Quanto ao volume recolhido de saliva (figura 24B e Anexo 2), observou-se que também para este parâmetro, não existem diferenças significativas entre grupos ( $p < 0,05$ ).

## R. Alterações no perfil proteico da saliva induzidas pela hiperleptinemia

### k) Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS PAGE)

No que diz respeito às amostras de saliva estudadas em termos de perfil proteico (SDS PAGE), utilizou-se um  $N=6$  para o grupo Controlo,  $N=9$  para o grupo soro e um  $N=7$  para o grupo leptina, tendo cada uma das amostras sido aplicada em pelo menos dois géis diferentes. Devido a variabilidade biológica da amostra em estudo, e à variabilidade inerente à técnica, considerou-se aceitável um intervalo de confiança de 90 %. As proteínas foram separadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, tendo-se aplicado uma quantidade de  $7,5 \mu\text{g}$  para cada uma das amostras, seguido de coloração com azul brilhante de Coomassie R-250 para visualização das bandas.

Na figura 25 é evidenciada a variabilidade inter-individual para cada uma das bandas proteicas, quer entre diferentes grupos, quer dentro do mesmo grupo.

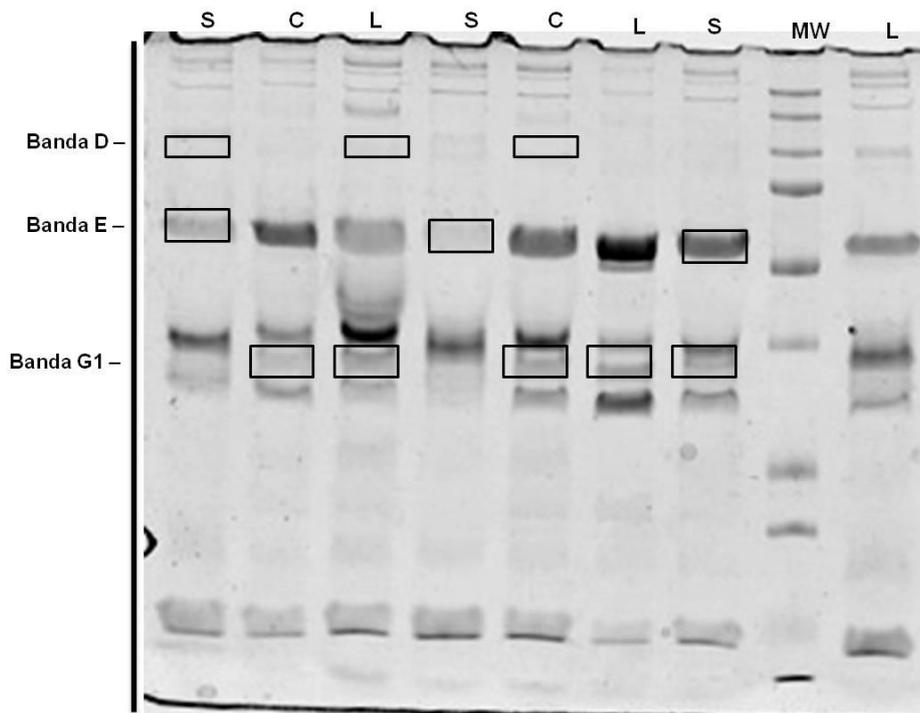


Figura 25 – Exemplo de um perfil proteico (SDS PAGE) de diferentes amostras dos três grupos experimentais, onde mostra a variabilidade inter-individual existente. S – soro; C – controle; L – leptina; MW – marcador de massas moleculares. As tres bandas assinaladas, bem como os rectangulos mostram exemplos de zonas onde essa variabilidade é evidente.

Como se pode observar na figura 25, há diversas bandas proteicas em que a referida variabilidade é evidente. Por exemplo, na banda D, nos vários animais deste perfil, observa-se a expressão desta banda em um dos indivíduos do grupo do soro não sendo a mesma observada nos perfis dos outros indivíduos do mesmo grupo. Situação semelhante acontece no grupo da leptina e do controle. Na banda G1 verifica-se o mesmo que na banda D, pois no grupo do soro neste perfil só aparece em um indivíduo. Outro exemplo é a banda E, que no grupo do soro está expressa em todos os indivíduos, mas em níveis diferentes.

Das 15 bandas proteicas observadas (1A – K) (figura 26) existe uma que não está presente em nenhuma amostra do grupo do soro.

Um dos indivíduos tratados com leptina (8 da 1ª fase) apresenta um perfil diferente de todos os restantes indivíduos desse grupo, para a maior parte das bandas proteicas, pelo que foi considerado *outlier*, sendo excluído da análise (Anexo 5). O mesmo aconteceu para o indivíduo 13 da 2ª fase, tratado com veículo, cuja observação do perfil nos géis SDS PAGE sugere a aplicação de quantidades reduzidas de proteína (Anexo 5).

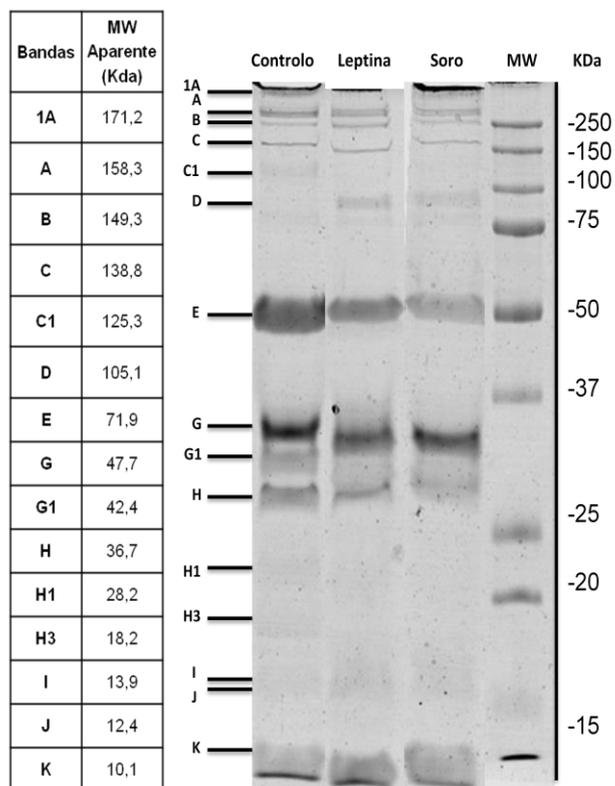


Figura 26 – Lanes representativas dos perfis proteicos para cada grupo experimental, e respectivas massas moleculares aparentes.

De modo a poder comparar amostras presentes em géis diferentes, a expressão das diversas bandas proteicas foi analisada em termos de percentagem de volume. O cálculo dessa percentagem de volume foi feito considerando o volume da banda individual em relação ao volume do total de bandas presentes na respetiva lane.

Verificou-se, para diversas bandas, que a distribuição não é normal, e nesses casos procedeu-se a análise dos dados através de testes não paramétricos (*Anexo 3*) – Kruskal Wallis, conforme descrito na secção de matérias e métodos. Para aquelas bandas cuja distribuição dos valores é normal (bandas A, B, E, G, H, I e J), foi feita uma ANOVA (*Anexo 3*). Observaram-se diferenças significativas, entre grupos, para a banda H3 ( $p < 0,1$ ). Esta banda apresenta expressão mais baixa no grupo do soro (tabela 1), não chegando mesmo a observar-se em nenhuma das lanes correspondentes a amostras deste grupo.

Observa-se também uma diferença estatisticamente significativa a nível da banda proteica H (*figura 26 e 27*), cuja expressão está diminuída nos indivíduos tratados com leptina, relativamente aos indivíduos controlo. Já em relação aos indivíduos do grupo do soro, há apenas uma tendência para menores expressões da banda H por parte dos animais do grupo da leptina (*tabela 2*).

Tabela 2 – Bandas diferencialmente expressas entre grupos [% de volume (média ± erro padrão)].

Banda	Grupo	Expressão (% de vol) <sup>#</sup>	P	MW
H	Leptina	7,43 ± 1,17	0,094*	36,672
	Controlo	13,93 ± 2,45		
	Leptina	7,43 ± 1,17	0,168	
	Soro	12,31 ± 1,57		
H3	Controlo	5,53 ± 0,99	0,055*	18,173
	Leptina	6,27 ± 1,45		
	Soro	0		

<sup>#</sup> Considerando todas as amostras, aplicadas nos diferentes géis SDS PAGE; \* diferença significativa para  $p < 0,1$

Para além das bandas proteicas, acima referidas, em que se observaram diferenças significativas, a banda E (figura 26 e 27) também parece diferir entre os grupos. No entanto, esta é uma banda em que existe uma grande variabilidade inter-individual dentro de cada grupo (Controlo 24,34 ± 6,98; Soro 18,67 ± 4,52; Leptina 10,40 ± 3,45), o que pode dificultar a obtenção de diferenças estatisticamente significativas. Analisando a frequência com que esta banda aparece em cada grupo, observa-se a sua presença em 83,3% dos indivíduos controlo, em 100% dos indivíduos do soro e em 66,7% dos indivíduos do grupo da leptina. Para além das diferenças na frequência com que aparece em cada grupo, quando aparece também parece haver uma tendência para uma menor expressão no grupo da leptina. Essa tendência é mais evidente quando se considera uma análise gel a gel (figura 27 e anexo 5).

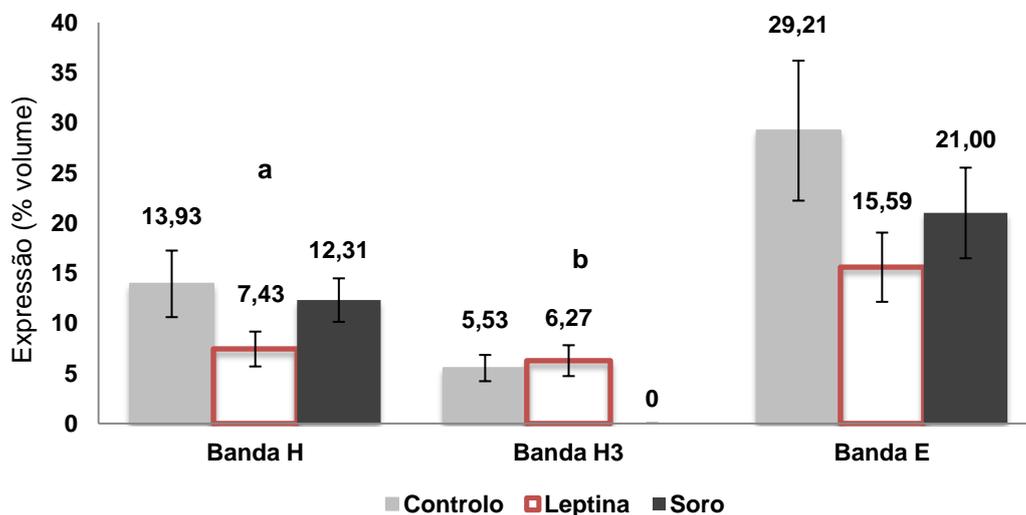


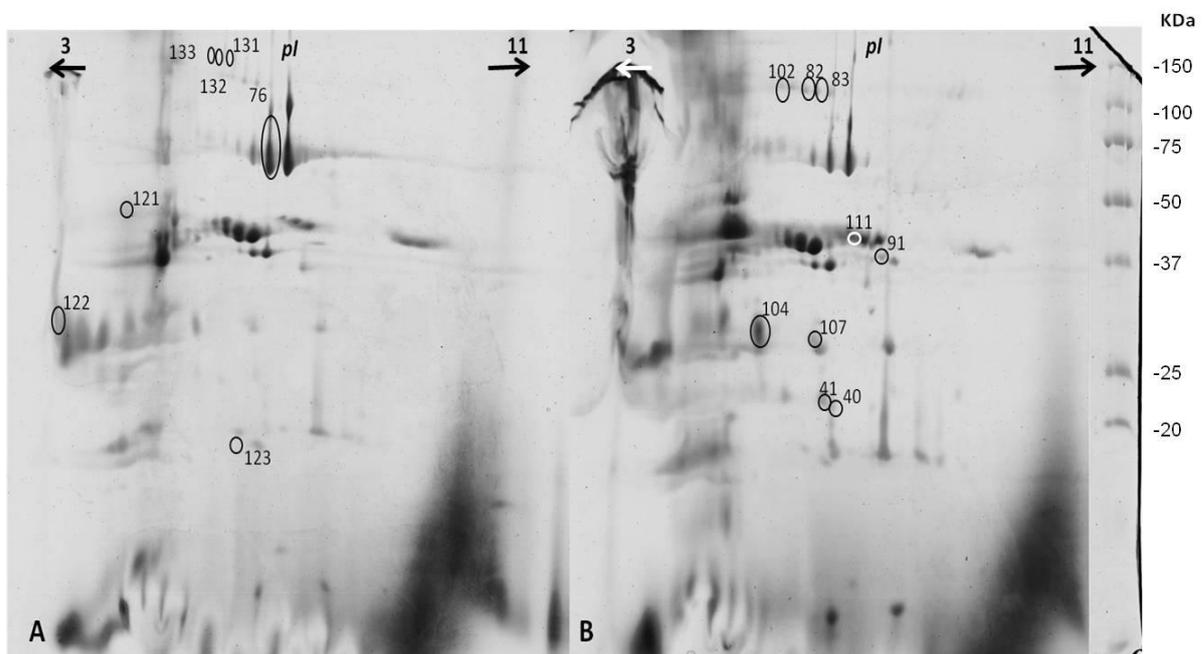
Figura 27 – Expressão (% volume) das bandas com diferenças estatisticamente significativas (banda H e H3) e da banda com tendência para baixa expressão a nível da leptina (banda E).

É também de notar que há valores de expressão muito elevados nos animais do grupo controlo e do grupo do soro para os indivíduos que apresentam expressão

(intervalo para os indivíduos que apresentam expressão: 10 - 47,15 e 7,5 - 40,98 respectivamente), o que não se observam em nenhum animal do grupo da leptina (intervalo para os indivíduos que apresentam expressão: 11,2 - 18,9).

### 1) Eletroforese Bi-dimENSIONAL (2D)

Géis de 4 indivíduos do tratamento com leptina e de 4 indivíduos do tratamento com veículo foram comparados. Optou-se pela comparação apenas entre indivíduos destes dois grupos, por estes apenas diferirem na presença ou ausência de leptina na solução administrada. Assim, é de esperar que as diferenças que sejam observadas entre os grupos se devam apenas ao efeito da hormona (*figura 28*).



*Figura 28 – Perfil proteico obtido por eletroforese bi-dimENSIONAL. Em cada imagem foram assinalados os spots cuja expressão foi observada como estando aumentada, relativamente ao outro grupo. A – grupo leptina; B – grupo soro.*

Um dos indivíduos do tratamento com leptina [8 (1ª fase)] apresentou um perfil diferente dos restantes 3 e muito próximo do perfil dos indivíduos tratados com veículo, pelo que foi considerado como *outlier*, tendo sido removido da análise. O fato de este indivíduo já ter aparecido como *outlier* nos perfis SDS-PAGE veio reforçar esta decisão.

Em termos de perfis bi-dimensionais, o tratamento com leptina resultou em diferenças em 16 *spots* proteicos, relativamente ao tratamento com veículo. Destes, 6 *spots* encontram-se com uma expressão (% de volume) significativamente mais elevada nos indivíduos que receberam leptina, comparativamente aos que receberam veículo, enquanto 1 *spot* apresenta uma expressão mais baixa (*ver figura 28, tabela 3 e Anexo 4*).

Tabela 3 – Spots diferencialmente expressos entre grupos [% de volume (média ± erro padrão)]

Spot	Expressão <sup>#</sup>		P	MW aparente (kDa)	pI aparente
	Soro	Leptina			
Maior expressão em indivíduos com hiperleptinemia					
40	0,118 ± 0,084	0,525 ± 0,083	0,019	18,9	5,9
41	0,316 ± 0,150	1,069 ± 0,098	0,009	19,8	5,8
82	0,188 ± 0,045	0,380 ± 0,040	0,025	94,4	5,6
83	0,187 ± 0,069	0,456 ± 0,067	0,039	91,0	5,8
91	0,054 ± 0,034	0,261 ± 0,071	<b>0,081<sup>§</sup></b>	34,5	6,1
102	0,041 ± 0,007	0,191 ± 0,016	0,005	97,9	5,4
Menor expressão em indivíduos com hiperleptinemia					
76	8,349 ± 1,847	4,013 ± 0,179	<b>0,100<sup>§</sup></b>	78,7	5,9
Spots apenas observados em géis de indivíduos com hiperleptinemia					
104	n.o.	3,444 ± 1,318	n.a.	25,7	5,3
107	n.o.	0,811 ± 0,057	n.a.	26,1	5,6
111	n.o.	0,413 ± 0,347	n.a.	37,1	6
Spots apenas observados em géis de indivíduos com soro					
121	0,519 ± 0,095	n.o.	n.a.	38,2	4,55
122	1,336 ± 0,783	n.o.	n.a.	24,8	3,4
123	0,318 ± 0,168	n.o.	n.a.	16,6	5,6
131	0,104 ± 0,026	n.o.	n.a.	113,2	5,6
132	0,104 ± 0,036	n.o.	n.a.	113,2	5,5
133	0,048 ± 0,010	n.o.	n.a.	113,2	5,5

<sup>§</sup> spots para os quais as diferenças apenas são significativas para um intervalo de confiança de 90%; n.o. – spot não observado com a coloração utilizada (azul brilhante de coomassie R-250); p<0,05; n.a. – não aplicável.

Para além destes, existem ainda 3 spots só observados no grupo tratado com leptina (significando uma maior expressão em animais tratados com esta hormona) e 6 spots apenas observados no grupo tratado com soro.

Para além destas diferenças estatisticamente significativas, há ainda um spot que apresenta um valor de P de 0,08 (spot 91), o qual apenas é observado num dos géis de indivíduos tratados com veículo, sendo a sua expressão nesse gel inferior à expressão observada em qualquer um dos géis do grupo tratado com leptina. Adicionalmente, o spot 76, cujo valor de P é de 0,1, também apresenta uma tendência para menor expressão no grupo da leptina. Neste caso, o spot está expresso em todos os indivíduos de ambos os grupos, mas os valores de expressão nos animais (figura 28) do grupo da leptina analisados são todos inferiores aos valores de expressão dos animais do grupo do soro. Pelos motivos já referidos para a análise dos géis SDS PAGE, também aqui é de considerar as diferenças para um intervalo de confiança de 90% (Anexo 4).

É ainda relevante referir que o spot 76 se encontra na zona de massas moleculares correspondentes às da banda E (nos perfis SDS PAGE), a qual, tal como foi referido anteriormente, também parece apresentar uma tendência para menor expressão

no grupo tratado com leptina. O *spot* 111 encontra-se próximo de massas moleculares correspondentes a banda H encontrada no perfil SDS PAGE (37,1 – 36,7 respectivamente). No entanto, o *spot* 111 apresenta maior expressão no grupo da leptina contrariamente a banda H. O *spot* 40, esta próximo da massa molecular da banda H3 do perfil SDS PAGE (18,9 – 18,2 respectivamente) e, tal como esta, também apresenta uma expressão mais baixa no grupo do soro.

## XIV. Discussão

O objetivo principal deste trabalho consistiu em avaliar alterações na composição proteica da saliva induzidas por hiperleptinemia.

Através do método ELISA, procedeu-se à determinação dos níveis plasmáticos da hormona em estudo. Verificou-se que os níveis aumentaram significativamente com a indução proposta, em que o grupo sujeito ao tratamento (leptina), apresentou níveis plasmáticos quatro vezes superiores aos valores obtidos nos restantes grupos. A utilização de implantes deste tipo para administração de leptina foi já usada noutros estudos, com resultados semelhantes (*Barazzoni et al., 2003*).

No que respeita à evolução do peso ao longo de todo o ensaio, verificou-se que estatisticamente não existem diferenças significativas entre grupos. No entanto, no grupo leptina após a indução da hiperleptinemia, mais propriamente a partir do 4<sup>a</sup> dia de ensaio, houve uma tendência para estes animais terem sempre menores ganhos e/ou maiores perdas de peso do que os animais tratados com veículo, tendência essa que não era visível antes do ensaio, sugerindo que houve influencia desta hormona.

A nível dos consumos, a indução de hiperleptinemia parece conduzir a menor ingestão de alimento. Apesar de só no terceiro dia se observarem diferenças significativa entre os grupos leptina e soro, desde o primeiro dia que se assiste a uma tendência para valores mais baixos, por parte dos animais tratados com esta hormona. Esta tendência não era observada no período anterior à colocação dos implantes, o que mostra existir um efeito da leptina.

As alterações no consumo de alimento por parte dos animais que receberam leptina demonstram que a hormona administrada através dos implantes usados neste estudo, teve efeito de saciedade. A leptina é uma hormona derivada principalmente dos adipócitos, tendo influência na ingestão alimentar e no gasto energético, dada a sua ação a nível dos centros reguladores da ingestão, no hipotálamo (*Bohlender et al., 2003*). Vários estudos, incluindo em roedores têm demonstrado esta influência da leptina sobre a nutrição (*Air et al. 2002*). Por exemplo observou-se que a administração de leptina em ratinhos obesos (ob/ob) reduz o apetite e conseqüentemente a ingestão de alimentos, e simultaneamente estimula a termogénese, aumenta o consumo de oxigénio e a atividade locomotora, originando uma diminuição acentuada do peso (cerca de 40% em 33 dias). De salientar que, a administração de leptina em ratinhos normoponderais associa-se, também, a uma diminuição do peso e da ingestão de alimentos, embora a intensidade da resposta seja menor do que a observada nos ob/ob (*Batista, 2002*).

Depois do 3<sup>o</sup> dia após colocação dos implantes, deixam de existir diferenças entre os grupos, quer a nível do consumo absoluto de alimento, quer a nível do consumo em

função do peso individual dos animais. Estes resultados, sugerem que os animais, ao fim de algum tempo, apresentam algum mecanismo de “ajuste” aos níveis mais elevados de leptina. *Paul Cohen et al. (2005)* trataram também ratos com leptina através de bombas osmóticas implantadas, e verificaram que a ingestão de alimentos atingiu o seu ponto mais baixo no terceiro dia, o que justificaram como estando associado ao tempo ao fim do qual havia ocorrido a depleção completa de massa de tecido adiposo. Depois disto, recuperaram a ingestão de alimentos e a perda de peso estabilizou, de forma semelhante aos nossos resultados.

No que diz respeito à análise da saliva mista, tanto a nível da concentração de proteína total, como a nível da taxa de secreção, verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre grupos, o que sugere que a leptina não interfere com estes dois parâmetros salivares.

A salivação é regulada principalmente pelo sistema nervoso autónomo simpático e parassimpático, em que o primeiro é, normalmente, responsável pela secreção de um menor volume de saliva, com maior concentração proteica, e o segundo por maior volume, sendo essa secreção mais aquosa (*Chiappin et al., 2007*). Tendo em conta que a leptina é referida como aumentando a atividade do sistema nervoso simpático em diversos órgãos, incluindo os sistemas reprodutivos, renais (*Tanida et al., 2013*) e cardiovasculares (*Acampa et al., 2008*), não é de excluir uma alteração da atividade deste ramo do sistema nervoso autónomo também ao nível das glândulas salivares. Assim, poderia esperar-se uma maior concentração em proteína total na saliva mista dos animais tratados com leptina. No entanto, isso não foi observado no presente trabalho. A taxa de secreção e a concentração de proteína total da saliva variam com muitos fatores (*Quintana et al., 2009*) incluindo a própria variabilidade inter-individual. Essa variabilidade pode justificar o não encontrar diferenças entre grupos. Uma análise que comparasse a salivação nos períodos anterior e posterior à administração de hormona poderia ajudar a esclarecer esta questão. Não foram encontrados estudos em que estes parâmetros fossem avaliados após indução de hiperleptinemia.

Vários estudos têm demonstrado uma potencial regulação da glândula salivar também por hormonas. No caso da leptina, a presença da forma funcional dos recetores desta hormona, a nível dos ácinos e dos ductos, foi já observada (*Balya et al., 2007*), sugerindo uma possível influência da mesma na salivação. O tecido adiposo presente no parênquima das glândulas salivares foi apontado como podendo ter um papel ativo na regulação da salivação, nomeadamente a nível da expressão da leptina salivar (*De Matteis et al., 2002*). A leptina não só foi vista como potencial regulador das glândulas, mas também como hormona produzida e secretada por estas (*Ueda et al., 2013*).

Com recurso a técnicas de separação proteica, foi possível observar diferenças no proteoma salivar entre os indivíduos pertencentes aos três grupos. Quer a separação unidimensional (de acordo com as massas moleculares), quer a bi-dimensional (de acordo com as massas moleculares e, simultaneamente, com os pontos isoelétricos) permitiram detetar variações do perfil proteico da saliva.

No que diz respeito aos perfis SDS PAGE, foram encontradas diferenças para as bandas com massas moleculares aparentes da ordem dos 18 e 28 kDa (H3 e H, respetivamente) sendo a primeira uma banda que apresenta maior expressão no grupo da leptina e a segunda uma banda de expressão diminuída. Na zona de massas moleculares correspondentes à banda H3, o *spot* que apresenta variações nos géis 2D, está menos expresso sugerindo que a maior expressão da banda H3, nos animais com hiperleptinemia terá que ser justificada por proteínas, de massa molecular semelhante, que contribuam para maiores diferenças a nível da expressão da banda nos géis SDS PAGE, mas que por terem pontos isoelétricos próximos dos extremos, não tenham sido visualizadas nos géis 2D. Já no que diz respeito à zona de massas moleculares correspondente à banda H, existem dois *spots* cuja expressão é maior para os animais que receberam leptina e um *spot* cuja expressão é menor. A identificação proteica destes *spots* será importante para ajudar a compreender as alterações observadas.

Uma banda cuja expressão se observou estar tendencialmente diminuída no grupo de animais tratados com leptina, relativamente aos tratados com veículo, foi a banda próxima dos 70 kDa. O *spot* 76 dos géis 2D apresenta uma massa molecular aparente da mesma ordem de grandeza, e também está diminuído no grupo da leptina. Apesar de no presente trabalho não terem sido feitas identificações das proteínas constituintes dos *spots* diferencialmente expressos, comparando os perfis obtidos com outros perfis de saliva mista de roedores existentes na bibliografia (*Beverly et al., 2012; Lamy et al., 2010*), é de crer que se trate da proteína alfa-amílase.

Contrariamente ao que seria de esperar, considerando a ativação do sistema nervoso autónomo por parte da leptina (*Nina et al., 2003*), não foi observado um aumento da expressão de amílase salivar. Esta é uma proteína salivar apontada como potencial marcador de atividade deste ramo do sistema nervoso autónomo (*Nater e Rohleder, 2009*). Diversos estudos mostraram que a estimulação simpática resulta na secreção de saliva parótida caracterizada por baixo fluxo salivar e concentrações de proteína total e amílase elevados (*Nater e Rohleder, 2009*).

A diminuição na expressão de alfa amílase salivar, observada no presente trabalho, sugere que, ou que não houve aumento da atividade do sistema nervoso autónomo a nível das glândulas salivares, para as concentrações de leptina

administradas, ou que a ação esta hormona nas glândulas salivares possa ser por outras vias, que não apenas através da influencia na atividade do sistema nervoso simpático.

Há vários estudos que observam a presença de recetores de leptina nos ácidos e ductos das glândulas salivares maiores (*Ueda et al., 2013*) pelo que não é de excluir que a ação da leptina possa ocorrer de forma direta a nível destas estruturas, modificando a composição da saliva.

Por outro lado sendo a leptina uma hormona responsável pelo aumento de saciedade, os efeitos da administração desta hormona poderiam ser semelhantes aos já descritos em estudos que avaliam a composição proteica da saliva nessas condições. Se assim fosse, seria de esperar um aumento, e não uma diminuição desta proteína salivar, uma vez que alguns autores observaram aumentos de amílase em situação de saciedade (*Harthoorn, 2008*). No entanto, no presente estudo observaram-se decréscimos no consumo de alimento (saciedade) apenas nos primeiros dias, pelo que o efeito de saciedade habitualmente referido para a leptina não parece observar-se ao fim dos 7 dias de administração da mesma.

Assim, outros estudos são necessários para avaliar se alguns dos efeitos referidos neste trabalho se devem a uma ação direta da leptina a nível dos recetores para esta hormona que se encontram nas glândulas salivares. Por exemplo, a realização de estudos *in vitro*, ou *in vivo* com canulação dos vasos que fazem o aporte de sangue para as glândulas e a colheita imediata deste fluido, através da canulação dos ductos das mesmas, poderiam dar nova informação.

## XV. Conclusão

A hiperleptinemia conduziu a diminuição no consumo de alimento, revertida ao fim de poucos dias de administração desta hormona.

Apesar de não provocar alterações na concentração em proteína total, nem na taxa de secreção, a administração de leptina conduziu a alterações na composição proteica da saliva mista. Há proteínas cuja expressão aumenta numa situação de hiperleptinemia, enquanto para outras a expressão diminui.

Parece existir uma diminuição na expressão relativa de uma isoforma de amilase salivar, o que vai em sentido contrário ao esperado, se considerarmos a possibilidade da atividade aumentada do sistema nervoso simpático, o que aponta no sentido de uma possível influência da leptina a nível da salivação que não passa pela ação indireta através da atividade deste ramo do sistema nervoso autónomo.

## XVI. Bibliografia

- ✓ Acampa Maurizio, Guideria Francesca, Hayekb Jousef, Blardia Patrizia, De Lallaa Arianna, Zappellab Michele, Auteria Alberto. Sympathetic over activity and plasma leptin levels in Rett syndrome. *Neuroscience Letters* (2008) 432:69–72.
- ✓ Air EL, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ & Woods SC. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology* 143 (2002) 2449–2452.
- ✓ Allison A. Venner, Martha E. Lyon, Patricia K. Doyle-Baker. Leptin: A potential biomarker for childhood obesity?. *Clinical Biochemistry* 39 (2006) 1047–1056.
- ✓ Amano O, Iseki S. Occurrence and nuclear localization of cAMP response element-binding protein in the postnatal development of the rat submandibular gland. *Histochem J* (1998) 30:591–601.7.
- ✓ Ambudkar IS. Regulation of calcium in salivary secretion. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (2000) 11:4–25.
- ✓ Ann DK, Lin HH. Regulation of salivary-gland-specific gene expression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (1997) 8:244–52.
- ✓ Balya Christine, Aiouna Josiane, Badonnela Karine, Lacroixa Marie-Christine, Durieuxa Didier, Schlegelb Claire, Salessea Roland, Caillola Monique. Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain research* (2007) 1129:130-141.
- ✓ Baptista Carla. Leptina. *Ata Medica Portuguesa* (2002) 15:281-285.
- ✓ Barazzoni Rocco, Zanetti Michela, Stebel Marco, Biolo Gianni, Cattin Luigi, and Guarnieri Gianfranco. Hyperleptinemia Prevents Increased Plasma Ghrelin Concentration During Short-term Moderate Caloric Restriction in Rats. *Gastroenterology* (2003) 124:1188–1192.
- ✓ Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol* (2002) 29:189–94.
- ✓ Baum BJ, Ambudkar IS, Horn VJ. Neurotransmitter control of calcium mobilization. In: Dobrosielski-Vergona K, editor. *Biology of the salivary glands*. Boca Raton: CRC Press; (1993) p. 153–79.
- ✓ Beverly Ariel B., Zhu Le, Fish Tara L., Thannhauser Theodore, Rutzke Mike A., and Miller Dennis D. Green Tea Ingestion by Rats Does Not Affect Iron Absorption but Does Alter the Composition of the Saliva Proteome. *Journal of Food Science* (2012) Vol. 77, Nr. 5.
- ✓ Bohlender J, Rauh M, Zenk J, Gröschl M. Differential distribution and expression of leptin and the functional leptin receptor in major salivary glands of humans. *Journal of Endocrinology* (2003) 178: 217 – 223.

- ✓ Bradley RM. Salivary secretion. In: Essentials of oral physiology. St. Louis: Mosby; (1995) p. 161–86.
- ✓ Breidert M., Miehke S., Glasow A., et al. Leptin and its receptor in normal human gastric mucosa and in Helicobacter pylori-associated gastritis. Gastroenterol (1999) 34: 954–961.
- ✓ Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science (1995) 269: 546–9.
- ✓ Campfield LA, Smith FJ. Overview. Neurobiology of OB protein (leptin). Proc Nutr Soc (1998) 57: 429–40.
- ✓ Castagnola M, Cabras T, Denotti G, Fadda MB, Gambarini G, Lupi A, et al. Circadian rhythms of histatin 1, histatin 3, histatin 5, statherin and uric acid in whole human saliva secretion. Biol Rhythm Res (2002) 33:213–22.
- ✓ Chen G, Koyama K, Yuan X, et al. Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA (1996) 93: 14795–9.
- ✓ Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., Morgenstern, J.P. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell (1996) 84, 491–495.
- ✓ Chiappin Silvia, Antonelli Giorgia, Gatti Rosalba, Elio F. De Palo. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. Clinica Chimica Acta (2007) 383:30–40.
- ✓ Chretien M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submandibular gland of the mouse. Int Rev Cytol (1977) 50:333–96.
- ✓ Christensen CM, Navazesh M. Anticipatory salivary flow to the sight of different foods. Appetite (1984) 5:307.
- ✓ Cinti S, De Matteis R, Picó C, et al. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. Int J Obes (2000) 24:789–93.
- ✓ Cohen Paul, Yang Guoqing, Yu Xinxin, Soukas Alexander A., Wolfish Cara S., Friedman Jeffrey M., and Cai Li. Induction of Leptin Receptor Expression in the Liver by Leptin. Food Deprivation (2005) Vol. 280, No. 11, pp. 10034–10039.
- ✓ Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF. The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. Diabetes (1996) 45(7):992–4.
- ✓ Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L., Caro, J.F.

- Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* (1996) 334, 292–295.
- ✓ Cuppler, W. A., Addressing leptin resistance; *Am. J. Physiol Reg Integ Comp Physiol* (2003) 284:R86.
  - ✓ Dall'Aglio C., Maranesi M., Pascucci L., Mercati F., Ceccarelli P. Immunohistochemical distribution of leptin receptor in the major salivary glands of horses. *Research in Veterinary Science* 93 (2012) 1116–1118.
  - ✓ Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* (1972) 220:529–45.
  - ✓ De Matteis, R., Puxeddu, R., Riva, A., Cinti, S. Intralobular ducts of human major salivary glands contain leptin and its receptor. *J. Anat.* 201 (2002) 363–370.
  - ✓ Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* (1992) 172:305–6.
  - ✓ Ekström J, Cevik Aras H. Parasympathetic non-adrenergic, non-cholinergic transmission in rat parotid glands: effects of cholecystinin-A and -B receptor antagonists on the secretory response. 146(1-3) (2008) 278-84.
  - ✓ Ferguson DB, Botchway CA. A comparison of circadian variation in the flow rate and composition of stimulated human parotid, submandibular and whole salivas from the same individuals. *Arch Oral Biol* (1980) 25:559–68.
  - ✓ Ferguson DB, Fort A, Elliott AL, Potts AJ. Circadian rhythms in human parotid saliva flow rate and composition. *Arch Oral Biol* (1973) 18:1155–73.
  - ✓ Field E., Longman, Tyldesley R. *Tyldesley's Oral medicine*. Oxford University Press, USA; 5 edition, 2003.
  - ✓ Frederich, R.C., Lollmann, B., Hamann, A., Napolitano-Rosen, A., Kahn, B.B., Lowell, B.B., Flier, J.S. Expression of ob mRNA and its Encoded Protein in Rodents - Impact of Nutrition and Obesity. *The Journal of Clinical Investigation* (1995a) v. 96, p.1658-1663.
  - ✓ Ghafouri B, Tagesson C, Lindahl M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics* (2003) 3: 1003–15.
  - ✓ Greabu M, Battino M, Mohora M, Totan A, Didilescu A, Spinu T, et al. Saliva—a diagnostic window to the body, both in health and in disease. *J Med Life* (2009) 2(2):124–32.
  - ✓ Gresik EW. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. *Microsc Res Tech* (1994) 27:1–24.
  - ✓ Groschl M., Rauh M., Wagner R., et al. Identification of leptin in human saliva. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2001) 86:5234–5239.

- ✓ Gusman H, Leone C, Helmerhorst EJ, Nunn M, Flora B, Troxler RF, et al. Human salivary gland-specific daily variations in histatin concentrations determined by a novel quantitation technique. *Arch Oral Biol* (2004) 49:11.
- ✓ Hand AR. Salivary glands. In: Bhaskar SN, editor. *Orban's oral histology and embryology*. St. Louis, MO: Mosby (1980) p. 336–70.
- ✓ Harpal S, Randevara, Emmanouil Karteris, Krzysztof C. Lewandowski, Sankaranarayanan Sailesh, Paul O'Hare, and Edward W. Hillhouse. Circadian rhythmicity of salivary leptin in healthy subjects; *Molecular Genetics and Metabolism* 78 (2003) 229–235.
- ✓ Harthoorn Lucien F. Salivary alfa-amylase: A measure associated with satiety and subsequent food intake in humans. *International Dairy Journal* (2008) 18:879-883.
- ✓ Hay DI, Smith DJ, Schluckebier SK, Moreno EC. Relationship between concentration of human salivary statherin and inhibition of calcium phosphate precipitation in stimulated human parotid saliva. *Journal of Dental Research* (1984) 63: 857–63.
- ✓ Hofman LF. Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr* (2001) 131:1621S–5S.
- ✓ Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* (2001) 85:162–169.
- ✓ Jonsson R, Kroneld U, Backman K, Magnusson B, Tarkowski A. Progression of sialoadenitis in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* (1993) 32:578–81.
- ✓ Kauffman DL, Keller PJ. The basic proline-rich proteins in human parotid saliva from a single subject. *Archives of Oral Biology* (1979) 24:249–56.
- ✓ Kelsay JL, McCague KE, Holden JM. Variations in flow rate, metabolites and enzyme activities of fasting human parotid saliva. *Arch Oral Biol* (1972) 17:439–45.
- ✓ Lamy Elsa, Graça Gonçalo, Costa Gonçalo da, Franco Catarina, Capela e Silva Fernando, Baptista Elvira Sales, Coelho Ana Varela. Changes in mouse whole saliva soluble proteome induced by tannin-enriched diet. *Proteome Science* (2010) 8:65.
- ✓ Laura C. Schulz and Eric P. Widmaier. Chapter 2, Leptin receptors, Department of Biology, Boston University, 2007.
- ✓ Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* (2006) 11:E449–55.
- ✓ Mandel ID. A contemporary view of salivary research. *Crit Rev Oral Biol Med* (1993) 4:599.
- ✓ Mandel ID. Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res* (1974) 53:246–66.
- ✓ Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *Journal of the American Dental Association* (1989) 119: 298–304.

- ✓ Martinez JR. Cellular mechanisms underlying the production of primary secretory fluid in salivary glands. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (1990) 1:67–78.
- ✓ Melvin JE. Saliva and dental disease. *Curr Opin Dent* (1991) 1:795—801.
- ✓ Mese H, Matsuo R. Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil* (2007) 34:711–723.
- ✓ Morton N.M., Emilsson V., Liu Y.L., Cawthorne M.A. Leptin action in intestinal cells, *J. Biol. Chem.* (1998) 273:26194–26201.
- ✓ Naggert J, Harris T, North M. The genetics of obesity. *Curr Op Gen Dev* 7 (1997) 398-404.
- ✓ Nagler RM, Hershkovich O. Age-related changes in unstimulated salivary function and composition and its relations to medications and oral sensorial complaints. *Aging Clin Exp Res* (2005) 17(5):358–66.
- ✓ Nagler RM. Salivary Glands and the Aging Process: Mechanistic Aspects, Health-Status and Medicinal-Efficacy Monitoring. *Biogerontology* (2004) 5(4):223–33.
- ✓ Nater U.M., Rohlender N. Salivary alpha amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology* (2009) 34, 486-496.
- ✓ Nieuw Amerongen A Van, JGM Bolscher, ECI Veerman. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology. *Caries Res* (2004) 38:247–53.
- ✓ Quintana Mercedes, Palicki Olivier, Lucchi Géraldine, Ducoroy Patrick, Chambon Christophe, Salles Christian, Morzel Martine. Inter-individual variability of protein patterns in saliva of healthy adults. *Journal of Proteomics* 72 (2009) 822-830.
- ✓ Raymond G. Schipper, Erika Silletti, Monique H. Vingerhoeds. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Oral biology* (2007) 52:1114-1135.
- ✓ Rexford S. Ahima, Suzette Y. Osei. Leptin signaling. *Physiology & Behavior* 81 (2004) 223– 241.
- ✓ Ricci Rebecca, Bevilacqua Francesca. The potential role of leptin and adiponectin in obesity: A comparative review. *The Veterinary Journal* (2012) 191:292–298.
- ✓ Rumantir MS, Vaz M, Jennings GL, et al. Neural mechanism in human obesity-related hypertension. *J Hypertens* (1999) 17: 1125-33.
- ✓ Scarpace, P.J., Zhang, Y. Leptin resistance: A predisposing factor for diet induced obesity. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (2009) 296:493–500.
- ✓ Schneider R., Bornstein S.R., Chrousos G.P., Boxberger S., Ehninger G., Breidert M. Leptin mediates a proliferative response in human gastric mucosa cells with functional receptor. *Horm. Metab. Res.* (2001) 33:1–6.

- ✓ Schwartz MW, Erickson J, Baskin DG, Palmiter RD. Leptin regulation of hypothalamic neuropeptide Y (NPY) gene transcription in vivo revealed by targeted mutation of the NPY gene. *Diabetes* (1997) 46:229.
- ✓ Seeley R, Stephens T, Tate P. *Anatomy and Physiology*. 8th ed. McGraw-Hill Science/Engineering/Math (2007).
- ✓ Shannon IL, Suddick RP, Dowd Jr FJ. *Saliva: composition and secretion*. *Monogr Oral Sci* (1974) 2:1.
- ✓ Speakman JR. Obesity: the integrated roles of environment and genetics. *J Nutr* (2004) 134(8 Suppl):2090S–105S.
- ✓ Sreebny LM. The salivary system. In: *Salivary electrolytes and fluid protection in health and disease*. Boca Raton, FL: CRC Press (1987) p. 95–122.
- ✓ Tanida M., Hayata A., Shintani N., Yamamoto N., Kurata Y., Shibamoto T., Morgan D. A., Rahmouni K. and Hashimoto H.. Central Pacap Mediates the Sympathetic effects of leptin in a tissue-specific manner. *Neuroscience* (2013) 238:297–304
- ✓ Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* (1995) 83(7):1263–71.
- ✓ Tucker AS, Miletich I. *Salivary Glands: Development, Adaptations and Disease*. 1st ed. S Karger Pub (2010).
- ✓ Turner RJ. Ion transport related to fluid secretion in salivary glands. In: Dobrosielski-Vergona K, editor. *Biology of the salivary glands*. Boca Raton: CRC Press (1993) p. 105–27.
- ✓ Ueda Hirota, Yagi Takakazu, Amitani Haruka, Asakawa Akihiro, Ikeda Satoshi, Miyawaki Shouichi, Inui Akio. The roles of salivary secretion, brain—gut peptides, and oral hygiene in obesity. *Obesity Research & Clinical Practice* (2013) 7, e321—e329.
- ✓ Veerman ECI, Van den Keijbus PAM, Vissink A, Van Nieuw Amerongen A. Human glandular salivas: their separate collection and analysis. *Euro J Oral Sci* (1996) 104:346–52.
- ✓ Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra PS, Kalra SP. Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake. *Physiol Behav* (1998) 64 (3):331–8.
- ✓ Zalewska A, Zwierz K, Zolkowski K, Gindzienski A. Structure and biosynthesis of human salivary mucins. *Acta Biochim Polonica* (2000) 47:1067–79.
- ✓ Zhang F, Basinski MB, Beals JM. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* (1997) 387(6629):206–9.

## XVII. Anexos

## S. Anexo 1 – Consumos e variação de peso

Tabela 4 – Valores obtidos para o consumo de ração (g) nos 4 dias antes e nos 6 dias depois da indução da hiperleptinemia.

	Rato	Antes da cirurgia				Rato	Depois da Cirurgia					
		Diário	Diário	Diário	Diário		Diário	Diário	Diário	Diário	Diário	Diário
Controlo	1	24,0	28,4	28,4	28,4	1	31,97	27,28	28,20	19,57	28,02	23,08
	2	26,7	28,9	28,9	28,9	2	38,32	25,41	33,42	14,19	29,48	22,10
	3	27,6	31,3	31,3	31,3	3	32,86	31,05	32,74	15,38	37,28	26,17
	11	23,3	26,2	26,2	26,2	11	31,27	22,67	28,70	15,20	24,02	24,92
	4F2	18,9	18,9	21,8	21,8	4F2	32,33	20,17	33,48	19,98	21,86	19,86
	7F2	19,7	19,7	23,0	23,0	7F2	33,85	23,38	33,43	19,21	27,62	20,9
	9F2	21,4	21,4	22,0	22,0	9F2	32,9	26,18	26,69	23,63	23,36	23,68
	15F2	20,5	20,5	20,2	20,2	15F2	30,39	25,36	28,43	21	20,61	22,3
	Media	22,8	24,4	25,2	25,2	Media	33,0	25,2	30,6	18,5	26,5	22,9
	DesvPad	3,2	4,8	4,0	4,0	DesvPad	2,4	3,3	2,9	3,3	5,4	2,1
Erro padrão	1,1	1,7	1,4	1,4	Erro padrão	0,8	1,2	1,0	1,2	1,9	0,7	
Leptina	13	25,25	26,22	26,22	26,22	13	26,80	13,64	27,55	10,78	28,90	28,56
	6	25,45	24,71	24,71	24,71	6	25,06	18,15	32,43	14,64	29,61	22,48
	7	27,38	27,07	27,07	27,07	7	27,73	19,77	27,89	15,57	28,39	21,46
	8	23,00	26,03	26,03	26,03	8	23,97	13,27	24,80	17,53	24,89	26,74
	11F2	19,845	19,845	19,45	19,45	11F2	28,83	23,93	28,46	21,66	24,33	20,98
	12F2	20,86	20,86	22,945	22,945	12F2	32,59	19,13	30,94	23,05	18,81	25,99
	14F2	19,865	19,865	18,415	18,415	14F2	26,07	22,63	29,07	18,01	21,67	24,3
	Media	23,1	23,5	23,5	23,5	Media	27,3	18,6	28,7	17,3	25,2	24,4
	DesvPad	3,0	3,2	3,4	3,4	DesvPad	2,8	4,1	2,5	4,2	4,0	2,9
Erro padrão	1,1	1,2	1,3	1,3	Erro padrão	1,1	1,5	0,9	1,6	1,5	1,1	
Soro	14	23,31	23,80	23,80	23,80	14	24,78	16,82	29,39	16,17	28,20	26,41
	10	26,95	23,40	23,40	23,40	10	28,31	20,02	35,06	21,45	30,50	28,68
	5	25,08	25,45	25,45	25,45	5	27,08	20,69	33,65	19,13	33,43	20,48
	1F2	18,205	18,205	22,1	22,1	1F2	27,34	21,67	30,69	19,5	28,05	20,15
	5F2	21,755	21,755	22,95	22,95	5F2	35,37	20,54	35,64	23,89	24,23	22,09
	8F2	19,615	19,615	23,925	23,925	8F2	30,62	21,55	33,68	19,93	23,22	26,64
	10F2	21,325	21,325	22,53	22,53	10F2	28,3	16,24	29,25	17,19	26,23	24,09
	13F2	19,28	19,28	22,18	22,18	13F2	35,79	23,1	32,82	22,85	25,09	26,32
	16F2	20,725	20,725	19,82	19,82	16F2	33,18	22,4	31,35	20,88	22,35	22,39
	Media	21,8	21,5	22,9	22,9	Media	30,1	20,3	32,4	20,1	26,8	24,1
	DesvPad	2,8	2,4	1,6	1,6	DesvPad	3,9	2,4	2,3	2,5	3,6	3,0
Erro padrão	0,9	0,8	0,5	0,5	Erro padrão	1,3	0,8	0,8	0,8	1,2	1,0	

Tabela 5 - Valores obtidos para a evolução do peso nos 4 dias antes e nos 6 dias depois da indução da hiperleptinemia.

	Rato	Antes da Cirurgia				Rato	Depois da Cirurgia					
		Diário	Diário	Diário	Diário		Diário	Diário	Diário	Diário	Diário	Diário
Controlo	1	348	352	356	360	1	353	356	356	357	361	360
	2	390	393	396	399	2	383	382	390	375	386	389
	3	411	413	416	418	3	411	408	409	407	408	413
	11	341	342	344	345	11	335	335	339	335	337	340
	4F2	345	348	350	351	4F2	352	345	354	356	356	355
	7F2	381	383	384	384	7F2	383	380	389	380	393	388
	9F2	374	376	378	376	9F2	374	372	373	369	375	373
	15F2	360	360	360	361	15F2	362	360	365	366	366	362
	Media	368,8	370,8	372,9	374,2	Media	369,1	367,3	371,9	368,1	372,8	372,5
	DesvPad	24,7	24,8	24,9	25,0	DesvPad	23,7	23,2	23,0	21,0	22,6	23,2
	Erro padrão	8,7	8,8	8,8	8,9	Erro padrão	8,4	8,2	8,1	7,4	8,0	8,2
Leptina	13	365	365	365	365	13	366	362	363	357	364	367
	6	368	368	369	369	6	366	365	373	359	373	368
	7	370	372	375	377	7	370	369	371	368	369	366
	8	359	363	366	370	8	364	362	366	365	359	365
	11F2	372	368	363	368	11F2	373	375	375	373	377	374
	12F2	370	374	377	379	12F2	380	369	377	383	376	375
	14F2	364	360	355	357	14F2	358	360	359	355	353	353
	Media	366,9	367,0	367,1	369,1	Media	368,1	366,0	369,1	365,7	367,3	366,9
	DesvPad	4,5	5,0	7,4	7,4	DesvPad	7,0	5,3	6,6	9,9	9,0	7,2
	Erro padrão	1,7	1,9	2,8	2,8	Erro padrão	2,7	2,0	2,5	3,8	3,4	2,7
Soro	14	390	390	391	391	14	384	386	391	389	392	391
	10	333	330	328	325	10	330	329	332	334	339	344
	5	380	379	379	378	5	375	379	383	381	391	388
	1F2	342	345	347	346	1F2	345	343	349	349	356	353
	5F2	370	372	373	375	5F2	376	369	378	378	379	381
	8F2	373	378	383	381	8F2	379	376	386	383	387	389
	10F2	351	355	358	358	10F2	358	351	364	355	367	363
	13F2	378	378	377	383	13F2	388	378	381	381	381	382
	16F2	350	350	350	354	16F2	357	354	361	363	358	355
	Media	363,0	364,0	365,0	365,5	Media	365,8	362,8	369,4	368,1	372,2	371,8
	DesvPad	19,5	19,9	20,5	21,3	DesvPad	19,5	19,4	19,5	18,8	18,3	18,0
	Erro padrão	6,5	6,6	6,8	7,1	erro padrão	6,5	6,5	6,5	6,3	6,1	6,0

Tabela 6 - Valores obtidos para o consumo de ração em função da evolução do peso nos 4 dias antes e nos 6 dias depois da indução da hiperleptinemia.

	Rato	Antes da Cirurgia				Rato	Depois da Cirurgia					
		Diário	Diário	Diário	Diário		Diário	Diário	Diário	Diário	Diário	Diário
Controlo	1	69	81	80	79	1	91	77	79	55	78	64
	2	68	74	73	72	2	100	67	86	38	76	57
	3	67	76	75	75	3	80	76	80	38	91	63
	11	68	77	76	76	11	93	68	85	45	71	73
	4F2	55	54	62	62	4F2	92	58	95	56	61	56
	7F2	52	52	60	60	7F2	88	62	86	51	70	54
	9F2	57	57	58	59	9F2	88	70	72	64	62	63
	15F2	57	57	56	56	15F2	84	70	78	57	56	62
	Media	62	66	68	67	Media	90	68	82	50	71	62
	DesvPad	7	12	9	9	DesvPad	6	6	7	9	11	6
erro padrão	3	4	3	3	Erro padrão	2	2	2	3	4	2	
Leptina	13	69	72	72	72	13	73	38	76	30	79	78
	6	69	67	67	67	6	68	50	87	41	79	61
	7	74	73	72	72	7	75	54	75	42	77	59
	8	64	72	71	70	8	66	37	68	48	69	73
	11F2	53	54	54	53	11F2	77	64	76	58	65	56
	12F2	56	56	61	61	12F2	86	52	82	60	50	69
	14F2	55	55	52	52	14F2	73	63	81	51	61	69
	Media	63	64	64	64	Media	74	51	78	47	69	66
	DesvPad	8	9	9	9	DesvPad	6	11	6	10	11	8
	erro padrão	3	3	3	3	Erro padrão	2	4	2	4	4	3
Soro	14	60	61	61	61	14	65	44	75	42	72	68
	10	81	71	71	72	10	86	61	106	64	90	83
	5	66	67	67	67	5	72	55	88	50	85	53
	1F2	53	53	64	64	1F2	79	63	88	56	79	57
	5F2	59	59	62	61	5F2	94	56	94	63	64	58
	8F2	53	52	62	63	8F2	81	57	87	52	60	68
	10F2	61	60	63	63	10F2	79	46	80	48	71	66
	13F2	51	51	59	58	13F2	92	61	86	60	66	69
	16F2	59	59	57	56	16F2	93	63	87	58	62	63
	Media	60	59	63	63	Media	82	56	88	55	72	65
	DesvPad	9	7	4	5	DesvPad	10	7	8	7	11	9
	erro padrão	3	2	1	2	erro padrão	3	2	3	2	4	3

## m) Análise Estatística do Consumo de ração

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Dia -5	controle	8	27,382	7,0568	2,4950	21,482	33,282	15,2	36,8
	soro	9	23,437	4,8140	1,6047	19,736	27,137	16,0	30,2
	leptina	7	24,267	2,1875	,8268	22,244	26,290	21,4	27,4
	Total	24	24,994	5,2496	1,0716	22,777	27,211	15,2	36,8
Dia -4	controle	8	22,758	3,2009	1,1317	20,082	25,434	18,9	27,6
	soro	9	21,804	2,8499	,9500	19,614	23,995	18,2	27,0
	leptina	7	23,091	3,0140	1,1392	20,303	25,878	19,8	27,4
	Total	24	22,498	2,9380	,5997	21,257	23,738	18,2	27,6
Dia -3	controle	8	24,427	4,8475	1,7139	20,374	28,479	18,9	31,3
	soro	9	21,506	2,3595	,7865	19,692	23,320	18,2	25,5
	leptina	7	23,514	3,2024	1,2104	20,553	26,476	19,8	27,1
	Total	24	23,065	3,6634	,7478	21,518	24,612	18,2	31,3
Dia -2	controle	8	25,246	4,0369	1,4273	21,871	28,621	20,2	31,3
	soro	9	22,906	1,5572	,5191	21,709	24,103	19,8	25,5
	leptina	7	23,549	3,4289	1,2960	20,377	26,720	18,4	27,1
	Total	24	23,873	3,1502	,6430	22,543	25,204	18,4	31,3
Dia -1	controle	8	25,246	4,0369	1,4273	21,871	28,621	20,2	31,3
	soro	9	22,906	1,5572	,5191	21,709	24,103	19,8	25,5
	leptina	7	23,549	3,4289	1,2960	20,377	26,720	18,4	27,1
	Total	24	23,873	3,1502	,6430	22,543	25,204	18,4	31,3
Dia 1	controle	8	32,986	2,4014	,8490	30,979	34,994	30,4	38,3
	soro	9	30,086	3,8953	1,2984	27,091	33,080	24,8	35,8
	leptina	7	27,293	2,8396	1,0733	24,667	29,919	24,0	32,6
	Total	24	30,238	3,7964	,7749	28,635	31,841	24,0	38,3
Dia 2	controle	8	25,188	3,2644	1,1541	22,458	27,917	20,2	31,1
	soro	9	20,337	2,3601	,7867	18,523	22,151	16,2	23,1
	leptina	7	18,646	4,0722	1,5392	14,880	22,412	13,3	23,9
	Total	24	21,460	4,1525	,8476	19,707	23,214	13,3	31,1
Dia 3	controle	8	30,636	2,8832	1,0194	28,226	33,047	26,7	33,5
	soro	9	32,392	2,3441	,7814	30,590	34,194	29,3	35,6
	leptina	7	28,734	2,4599	,9297	26,459	31,009	24,8	32,4
	Total	24	30,740	2,8838	,5886	29,522	31,958	24,8	35,6
Dia 4	controle	8	18,520	3,2864	1,1619	15,772	21,268	14,2	23,6
	soro	9	20,110	2,4900	,8300	18,196	22,024	16,2	23,9
	leptina	7	17,320	4,1874	1,5827	13,447	21,193	10,8	23,1
	Total	24	18,766	3,3737	,6887	17,342	20,191	10,8	23,9
Dia 5	controle	8	26,531	5,3569	1,8940	22,053	31,010	20,6	37,3
	soro	9	26,811	3,5993	1,1998	24,044	29,578	22,4	33,4
	leptina	7	25,229	4,0302	1,5233	21,501	28,956	18,8	29,6
	Total	24	26,256	4,2362	,8647	24,467	28,045	18,8	37,3
Dia 6	controle	8	22,876	2,0581	,7277	21,156	24,597	19,9	26,2
	soro	9	24,139	3,0280	1,0093	21,811	26,466	20,2	28,7
	leptina	7	24,359	2,8675	1,0838	21,707	27,011	21,0	28,6

	Total	24	23,782	2,6570	,5424	22,660	24,904	19,9	28,7
--	-------	----	--------	--------	-------	--------	--------	------	------

Comparação (One-way ANOVA)								
Multiple Comparisons								
Dependent Variable		(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
Dia -5	Tukey HSD	controle	soro	3,9452	2,5153	0,281	-2,395	10,285
			leptina	3,1147	2,6790	0,488	-3,638	9,867
		soro	controle	-3,9452	2,5153	0,281	-10,285	2,395
			leptina	-,8305	2,6087	0,946	-7,406	5,745
		leptina	controle	-3,1147	2,6790	0,488	-9,867	3,638
			soro	0,8305	2,6087	0,946	-5,745	7,406
Dia -4	Tukey HSD	controle	soro	0,9537	1,4662	0,794	-2,742	4,649
			leptina	-0,3326	1,5617	0,975	-4,269	3,604
		soro	controle	-0,9537	1,4662	0,794	-4,649	2,742
			leptina	-1,2863	1,5206	0,679	-5,119	2,547
		leptina	controle	0,3326	1,5617	0,975	-3,604	4,269
			soro	1,2863	1,5206	0,679	-2,547	5,119
Dia -3	Tukey HSD	controle	soro	2,9206	1,7441	0,238	-1,476	7,317
			leptina	0,9124	1,8577	0,876	-3,770	5,595
		soro	controle	-2,9206	1,7441	0,238	-7,317	1,476
			leptina	-2,0082	1,8089	0,519	-6,568	2,551
		leptina	controle	-0,9124	1,8577	0,876	-5,595	3,770
			soro	2,0082	1,8089	0,519	-2,551	6,568
Dia -2	Tukey HSD	controle	soro	2,3399	1,5145	0,291	-1,478	6,157
			leptina	1,6975	1,6132	0,553	-2,369	5,764
		soro	controle	-2,3399	1,5145	0,291	-6,157	1,478
			leptina	-,6425	1,5708	0,912	-4,602	3,317
		leptina	controle	-1,6975	1,6132	0,553	-5,764	2,369
			soro	,6425	1,5708	0,912	-3,317	4,602
Dia -1	Tukey HSD	controle	soro	2,3399	1,5145	0,291	-1,478	6,157
			leptina	1,6975	1,6132	0,553	-2,369	5,764
		soro	controle	-2,3399	1,5145	0,291	-6,157	1,478
			leptina	-,6425	1,5708	0,912	-4,602	3,317
		leptina	controle	-1,6975	1,6132	0,553	-5,764	2,369
			soro	,6425	1,5708	0,912	-3,317	4,602
Dia 1	Tukey HSD	controle	soro	2,9007	1,5371	0,167	-0,974	6,775
			leptina	5,6934 <sup>*</sup>	1,6372	0,006	1,567	9,820
		soro	controle	-2,9007	1,5371	0,167	-6,775	0,974
			leptina	2,7927	1,5942	0,210	-1,225	6,811
		leptina	controle	-5,6934 <sup>*</sup>	1,6372	0,006	-9,820	-1,567
			soro	-2,7927	1,5942	0,210	-6,811	1,225
Dia 2	Tukey HSD	controle	soro	4,8508 <sup>*</sup>	1,5679	0,015	0,899	8,803
			leptina	6,5418 <sup>*</sup>	1,6700	0,002	2,332	10,751
		soro	controle	-4,8508 <sup>*</sup>	1,5679	0,015	-8,803	-0,899
			leptina	1,6910	1,6261	0,561	-2,408	5,790
		leptina	controle	-6,5418 <sup>*</sup>	1,6700	0,002	-10,751	-2,332
			soro	-1,6910	1,6261	0,561	-5,790	2,408
Dia 3	Tukey HSD	controle	soro	-1,7560	1,2477	0,355	-4,901	1,389
			leptina	1,9020	1,3289	0,344	-1,448	5,252
		soro	controle	1,7560	1,2477	0,355	-1,389	4,901

			leptina	3,6579*	1,2940	0,026	0,396	6,920
		leptina	controlo	-1,9020	1,3289	0,344	-5,252	1,448
			soro	-3,6579*	1,2940	0,026	-6,920	-,396
Dia 4	Tukey HSD	controlo	soro	-1,5900	1,6095	0,592	-5,647	2,467
			leptina	1,2000	1,7143	0,766	-3,121	5,521
		soro	controlo	1,5900	1,6095	0,592	-2,467	5,647
			leptina	2,7900	1,6693	0,239	-1,418	6,998
		leptina	controlo	-1,2000	1,7143	0,766	-5,521	3,121
			soro	-2,7900	1,6693	0,239	-6,998	1,418
Dia 5	Tukey HSD	controlo	soro	-,2799	2,1259	0,990	-5,638	5,079
			leptina	1,3027	2,2643	0,835	-4,405	7,010
		soro	controlo	,2799	2,1259	0,990	-5,079	5,638
			leptina	1,5825	2,2048	0,756	-3,975	7,140
		leptina	controlo	-1,3027	2,2643	0,835	-7,010	4,405
			soro	-1,5825	2,2048	0,756	-7,140	3,975
Dia 6	Tukey HSD	controlo	soro	-1,2626	1,3087	0,607	-4,561	2,036
			leptina	-1,4823	1,3939	0,546	-4,996	2,031
		soro	controlo	1,2626	1,3087	0,607	-2,036	4,561
			leptina	-,2197	1,3573	0,986	-3,641	3,202
		leptina	controlo	1,4823	1,3939	0,546	-2,031	4,996
			soro	,2197	1,3573	0,986	-3,202	3,641
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.								

## n) Análise Estatística da Variação do Peso:

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Dia -5	Controlo	8	367,7188	25,07789	8,86637	346,7531	388,6844	338,50	409,00
	Soro	9	361,6667	19,79899	6,59966	346,4478	376,8855	328,00	386,50
	Leptina	7	365,5000	5,43331	2,05360	360,4750	370,5250	356,00	371,50
	Total	24	364,8021	18,50426	3,77717	356,9884	372,6157	328,00	409,00
Dia-4	Controlo	8	368,75	24,656	8,717	348,14	389,36	341	411
	Soro	9	363,00	19,513	6,504	348,00	378,00	333	390
	Leptina	7	366,86	4,488	1,696	362,71	371,01	359	372
	Total	24	366,04	18,141	3,703	358,38	373,70	333	411
Dia -3	Controlo	8	370,833	24,7535	8,7517	350,1388	391,5278	342,3	413,3
	Soro	9	364,000	19,8840	6,6280	348,7157	379,2842	330,3	390,3
	Leptina	7	366,976	5,0290	1,9007	362,3251	371,6272	359,5	373,5
	Total	24	367,145	18,4178	3,7595	359,3686	374,9229	330,3	413,3
Dia -2	Controlo	8	372,916	24,9079	8,8062	352,0931	393,7402	343,6	415,6
	Soro	9	365,000	20,5223	6,8407	349,2251	380,7748	327,6	390,6
	Leptina	7	367,095	7,3703	2,7857	360,2787	373,9117	355,0	377,0
	Total	24	368,250	19,0156	3,8815	360,2203	376,2796	327,6	415,6
Dia -1	Controlo	8	374,188	25,0427	8,8539	353,251	395,124	345,0	418,0
	Soro	9	365,500	21,3234	7,1078	349,109	381,891	325,0	391,0
	Leptina	7	369,143	7,3977	2,7961	362,301	375,985	356,5	378,5
	Total	24	369,458	19,4226	3,9646	361,257	377,660	325,0	418,0
Dia 1	Controlo	8	369,125	23,6971	8,3782	349,314	388,936	335,0	411,0
	Soro	9	365,778	19,4922	6,4974	350,795	380,761	330,0	388,0
	Leptina	7	368,143	7,0339	2,6586	361,638	374,648	358,0	380,0
	Total	24	367,583	17,8372	3,6410	360,051	375,115	330,0	411,0
Dia 2	Controlo	8	367,250	23,2302	8,2131	347,829	386,671	335,0	408,0
	Soro	9	362,778	19,3506	6,4502	347,904	377,652	329,0	386,0
	Leptina	7	366,000	5,2915	2,0000	361,106	370,894	360,0	375,0
	Total	24	365,208	17,4853	3,5692	357,825	372,592	329,0	408,0
Dia 3	Controlo	8	371,875	22,9934	8,1294	352,652	391,098	339,0	409,0
	Soro	9	369,444	19,5263	6,5088	354,435	384,454	332,0	391,0
	Leptina	7	369,143	6,6440	2,5112	362,998	375,288	359,0	377,0
	Total	24	370,167	17,5094	3,5741	362,773	377,560	332,0	409,0
Dia 4	Controlo	8	368,125	20,9519	7,4076	350,609	385,641	335,0	407,0
	Soro	9	368,111	18,7580	6,2527	353,692	382,530	334,0	389,0
	Leptina	7	365,714	9,9451	3,7589	356,517	374,912	355,0	383,0
	Total	24	367,417	16,8237	3,4341	360,313	374,521	334,0	407,0
Dia 5	Controlo	8	372,750	22,6006	7,9905	353,855	391,645	337,0	408,0
	Soro	9	372,222	18,3083	6,1028	358,149	386,295	339,0	392,0
	Leptina	7	367,286	9,0317	3,4137	358,933	375,639	353,0	377,0
	Total	24	370,958	17,2966	3,5307	363,655	378,262	337,0	408,0
Dia 6	Controlo	8	372,500	23,2440	8,2180	353,067	391,933	340,0	413,0
	Soro	9	371,778	18,0331	6,0110	357,916	385,639	344,0	391,0

	Leptina	7	366,857	7,2440	2,7380	360,158	373,557	353,0	375,0
	Total	24	370,583	17,2423	3,5196	363,303	377,864	340,0	413,0

Multiple Comparisons								
Dependent Variable	(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
Dia -5	Tukey HSD	Controlo	Soro	6,05208	9,31384	,795	-17,4241	29,5283
			Leptina	2,21875	9,92024	,973	-22,7859	27,2234
		Soro	Controlo	-6,05208	9,31384	,795	-29,5283	17,4241
			Leptina	-3,83333	9,65962	,917	-28,1811	20,5144
		Leptina	Controlo	-2,21875	9,92024	,973	-27,2234	22,7859
			Soro	3,83333	9,65962	,917	-20,5144	28,1811
Dia-4	Tukey HSD	Controlo	Soro	5,750	9,135	,806	-17,28	28,78
			Leptina	1,893	9,730	,979	-22,63	26,42
		Soro	Controlo	-5,750	9,135	,806	-28,78	17,28
			Leptina	-3,857	9,474	,913	-27,74	20,02
		Leptina	Controlo	-1,893	9,730	,979	-26,42	22,63
			Soro	3,857	9,474	,913	-20,02	27,74
Dia-3	Tukey HSD	Controlo	Soro	6,8333	9,24628	,743	-16,47257	30,139237
			Leptina	3,8571	9,848283	,919	-20,96614	28,68043
		Soro	Controlo	-6,8333	9,2462818	,743	-30,13923	16,47257
			Leptina	-2,9761	9,589558	,948	-27,147348	21,19496
		Leptina	Controlo	-3,85714	9,848283	,919	-28,68043	20,9661
			Soro	2,976190	9,5895	,948	-21,194967	27,14734
Dia-2	Tukey HSD	Controlo	Soro	7,91666	9,50660	,687	-16,0453	31,87872
			Leptina	5,821428	10,1255	,835	-19,70074	31,343597
		Soro	Controlo	-7,916666	9,506602	,687	-31,8787	16,04539
			Leptina	-2,095238	9,8595	,975	-26,94691	22,7564
		Leptina	Controlo	-5,82142	10,125553	,835	-31,34359	19,7007
			Soro	2,0952	9,8595	,975	-22,75643	26,9469
Dia-1	Tukey HSD	Controlo	Soro	8,6875	9,6927	,649	-15,744	33,119
			Leptina	5,0446	10,3237	,877	-20,977	31,066
		Soro	Controlo	-8,6875	9,6927	,649	-33,119	15,744
			Leptina	-3,6429	10,0525	,930	-28,981	21,695
		Leptina	Controlo	-5,0446	10,3237	,877	-31,066	20,977
			Soro	3,6429	10,0525	,930	-21,695	28,981
Dia 1	Tukey HSD	Controlo	Soro	3,3472	9,0393	,927	-19,437	26,131
			Leptina	,9821	9,6278	,994	-23,285	25,250
		Soro	Controlo	-3,3472	9,0393	,927	-26,131	19,437
			Leptina	-2,3651	9,3749	,966	-25,995	21,265
		Leptina	Controlo	-,9821	9,6278	,994	-25,250	23,285
			Soro	2,3651	9,3749	,966	-21,265	25,995
Dia 2	Tukey HSD	Controlo	Soro	4,4722	8,8341	,869	-17,795	26,739
			Leptina	1,2500	9,4092	,990	-22,467	24,967
		Soro	Controlo	-4,4722	8,8341	,869	-26,739	17,795
			Leptina	-3,2222	9,1621	,934	-26,316	19,871
		Leptina	Controlo	-1,2500	9,4092	,990	-24,967	22,467
			Soro	3,2222	9,1621	,934	-19,871	26,316
Dia 3	Tukey HSD	Controlo	Soro	2,4306	8,8816	,960	-19,956	24,817
			Leptina	2,7321	9,4599	,955	-21,112	26,576
		Soro	Controlo	-2,4306	8,8816	,960	-24,817	19,956

			Leptina	,3016	9,2114	,999	-22,916	23,519
		Leptina	Controlo	-2,7321	9,4599	,955	-26,576	21,112
			Soro	-,3016	9,2114	,999	-23,519	22,916
Dia 4	Tukey HSD	Controlo	Soro	,0139	8,5364	1,000	-21,503	21,531
			Leptina	2,4107	9,0922	,962	-20,507	25,328
		Soro	Controlo	-,0139	8,5364	1,000	-21,531	21,503
			Leptina	2,3968	8,8533	,960	-19,919	24,712
		Leptina	Controlo	-2,4107	9,0922	,962	-25,328	20,507
			Soro	-2,3968	8,8533	,960	-24,712	19,919
Dia 5	Tukey HSD	Controlo	Soro	,5278	8,7094	,998	-21,425	22,480
			Leptina	5,4643	9,2764	,827	-17,918	28,846
		Soro	Controlo	-,5278	8,7094	,998	-22,480	21,425
			Leptina	4,9365	9,0327	,849	-17,831	27,704
		Leptina	Controlo	-5,4643	9,2764	,827	-28,846	17,918
			Soro	-4,9365	9,0327	,849	-27,704	17,831
Dia 6	Tukey HSD	Controlo	Soro	,7222	8,6783	,996	-21,152	22,596
			Leptina	5,6429	9,2433	,816	-17,656	28,941
		Soro	Controlo	-,7222	8,6783	,996	-22,596	21,152
			Leptina	4,9206	9,0005	,849	-17,766	27,607
		Leptina	Controlo	-5,6429	9,2433	,816	-28,941	17,656
			Soro	-4,9206	9,0005	,849	-27,607	17,766

## o) Análise Estatística do Consumo em função do peso:

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Dia -5	controle	8	74,141	17,3302	6,1271	59,653	88,629	44,2	97,1
	soro	9	64,862	13,3828	4,4609	54,575	75,149	45,7	82,2
	leptina	7	66,382	5,7253	2,1640	61,087	71,677	59,0	74,4
	Total	24	68,399	13,4109	2,7375	62,736	74,062	44,2	97,1
Dia -4	controle	8	61,683	7,1807	2,5388	55,680	67,686	51,8	68,9
	soro	9	60,253	9,0685	3,0228	53,282	67,224	51,0	80,9
	leptina	7	62,952	8,2246	3,1086	55,345	70,558	53,3	74,0
	Total	24	61,517	7,9501	1,6228	58,160	64,874	51,0	80,9
Dia -3	controle	8	65,817	11,9159	4,2129	55,855	75,779	51,6	80,8
	soro	9	59,182	6,7251	2,2417	54,013	64,352	51,1	70,8
	leptina	7	64,072	8,6586	3,2726	56,065	72,080	54,0	72,7
	Total	24	62,820	9,3425	1,9070	58,875	66,765	51,1	80,8
Dia -2	controle	8	67,656	9,4329	3,3350	59,770	75,542	56,1	79,9
	soro	9	62,847	4,3776	1,4592	59,482	66,212	56,6	71,4
	leptina	7	64,069	8,6961	3,2868	56,027	72,112	51,9	72,2
	Total	24	64,806	7,6136	1,5541	61,592	68,021	51,9	79,9
Dia -1	controle	8	67,394	9,1267	3,2268	59,764	75,024	55,9	79,0
	soro	9	62,793	4,7514	1,5838	59,140	66,445	56,1	72,0
	leptina	7	63,726	8,7453	3,3054	55,638	71,814	51,7	71,8
	Total	24	64,599	7,5750	1,5462	61,400	67,797	51,7	79,0
Dia 1	controle	8	89,507	6,0750	2,1478	84,429	94,586	80,0	100,1
	soro	9	82,319	10,0149	3,3383	74,621	90,017	64,5	94,1
	leptina	7	74,053	6,4428	2,4351	68,094	80,011	65,9	85,8
	Total	24	82,304	9,7835	1,9971	78,173	86,435	64,5	100,1
Dia 2	controle	8	68,467	6,3825	2,2565	63,131	73,803	58,5	76,6
	soro	9	56,203	7,1298	2,3766	50,723	61,684	43,6	63,3
	leptina	7	50,880	10,7772	4,0734	40,912	60,847	36,7	63,8
	Total	24	58,738	10,7055	2,1853	54,218	63,259	36,7	76,6
Dia 3	controle	8	82,447	6,8697	2,4288	76,704	88,190	71,6	94,6
	soro	9	87,938	8,4986	2,8329	81,406	94,471	75,2	105,6
	leptina	7	77,816	6,1492	2,3242	72,129	83,503	67,8	86,9
	Total	24	83,155	8,1947	1,6727	79,695	86,616	67,8	105,6
Dia 4	controle	8	50,489	9,4791	3,3514	42,564	58,414	37,8	64,0
	soro	9	54,781	7,4088	2,4696	49,086	60,476	41,6	64,2
	leptina	7	47,185	10,4413	3,9465	37,529	56,842	30,2	60,2
	Total	24	51,135	9,2181	1,8816	47,242	55,027	30,2	64,2
Dia 5	controle	8	70,866	11,1598	3,9456	61,536	80,196	56,3	91,4
	soro	9	72,210	10,5454	3,5151	64,104	80,315	60,0	90,0
	leptina	7	68,714	10,9262	4,1297	58,609	78,819	50,0	79,4
	Total	24	70,742	10,4798	2,1392	66,317	75,167	50,0	91,4
Dia 6	controle	8	61,560	6,1464	2,1731	56,422	66,699	53,9	73,3
	soro	9	65,064	8,9312	2,9771	58,199	71,930	52,8	83,4
	leptina	7	66,435	8,0268	3,0339	59,011	73,858	56,1	77,8

	Total	24	64,296	7,7638	1,5848	61,018	67,574	52,8	83,4
--	-------	----	--------	--------	--------	--------	--------	------	------

Multiple Comparisons							
Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dia -5	controlelo	soro	9,2786	6,4775	,343	-7,048	25,606
		leptina	7,7587	6,8993	,510	-9,631	25,149
	soro	controlelo	-9,2786	6,4775	,343	-25,606	7,048
		leptina	-1,5199	6,7180	,972	-18,453	15,413
	leptina	controlelo	-7,7587	6,8993	,510	-25,149	9,631
		soro	1,5199	6,7180	,972	-15,413	18,453
Dia -4	controlelo	soro	1,4300	4,0023	,932	-8,658	11,518
		leptina	-1,2685	4,2629	,952	-12,013	9,476
	soro	controlelo	-1,4300	4,0023	,932	-11,518	8,658
		leptina	-2,6985	4,1509	,794	-13,161	7,764
	leptina	controlelo	1,2685	4,2629	,952	-9,476	12,013
		soro	2,6985	4,1509	,794	-7,764	13,161
Dia -3	controlelo	soro	6,6346	4,5056	,324	-4,722	17,991
		leptina	1,7444	4,7990	,930	-10,352	13,841
	soro	controlelo	-6,6346	4,5056	,324	-17,991	4,722
		leptina	-4,8902	4,6729	,557	-16,669	6,888
	leptina	controlelo	-1,7444	4,7990	,930	-13,841	10,352
		soro	4,8902	4,6729	,557	-6,888	16,669
Dia -2	controlelo	soro	4,8092	3,7186	,414	-4,564	14,182
		leptina	3,5870	3,9608	,643	-6,396	13,570
	soro	controlelo	-4,8092	3,7186	,414	-14,182	4,564
		leptina	-1,2222	3,8567	,946	-10,943	8,499
	leptina	controlelo	-3,5870	3,9608	,643	-13,570	6,396
		soro	1,2222	3,8567	,946	-8,499	10,943
Dia -1	controlelo	soro	4,6014	3,7075	,443	-4,744	13,946
		leptina	3,6676	3,9489	,629	-6,286	13,621
	soro	controlelo	-4,6014	3,7075	,443	-13,946	4,744
		leptina	-,9338	3,8452	,968	-10,626	8,758
	leptina	controlelo	-3,6676	3,9489	,629	-13,621	6,286
		soro	,9338	3,8452	,968	-8,758	10,626
Dia 1	controlelo	soro	7,1882	3,8375	,171	-2,485	16,861
		leptina	15,4548	4,0873	,003	5,152	25,757
	soro	controlelo	-7,1882	3,8375	,171	-16,861	2,485
		leptina	8,2667	3,9800	,119	-1,765	18,298
	leptina	controlelo	-15,4548	4,0873	,003	-25,757	-5,152
		soro	-8,2667	3,9800	,119	-18,298	1,765
Dia 2	controlelo	soro	12,2634	3,9514	,014	2,304	22,223
		leptina	17,5870	4,2087	,001	6,979	28,195
	soro	controlelo	-12,2634	3,9514	,014	-22,223	-2,304
		leptina	5,3235	4,0981	,411	-5,006	15,653
	leptina	controlelo	-17,5870	4,2087	,001	-28,195	-6,979
		soro	-5,3235	4,0981	,411	-15,653	5,006
Dia 3	controlelo	soro	-5,4914	3,5723	,294	-14,496	3,513
		leptina	4,6311	3,8049	,457	-4,960	14,222
	soro	controlelo	5,4914	3,5723	,294	-3,513	14,496

		leptina	10,1225*	3,7050	,032	,784	19,461
	leptina	controle	-4,6311	3,8049	,457	-14,222	4,960
		soro	-10,1225*	3,7050	,032	-19,461	-,784
Dia 4	controle	soro	-4,2920	4,4004	,600	-15,384	6,800
		leptina	3,3034	4,6869	,763	-8,510	15,117
	soro	controle	4,2920	4,4004	,600	-6,800	15,384
		leptina	7,5955	4,5638	,242	-3,908	19,099
	leptina	controle	-3,3034	4,6869	,763	-15,117	8,510
		soro	-7,5955	4,5638	,242	-19,099	3,908
Dia 5	controle	soro	-1,3435	5,2781	,965	-14,647	11,960
		leptina	2,1520	5,6217	,923	-12,018	16,322
	soro	controle	1,3435	5,2781	,965	-11,960	14,647
		leptina	3,4955	5,4740	,801	-10,302	17,293
	leptina	controle	-2,1520	5,6217	,923	-16,322	12,018
		soro	-3,4955	5,4740	,801	-17,293	10,302
Dia 6	controle	soro	-3,5043	3,8072	,634	-13,101	6,092
		leptina	-4,8746	4,0550	,465	-15,096	5,346
	soro	controle	3,5043	3,8072	,634	-6,092	13,101
		leptina	-1,3703	3,9485	,936	-11,323	8,582
	leptina	controle	4,8746	4,0550	,465	-5,346	15,096
		soro	1,3703	3,9485	,936	-8,582	11,323
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.							

## T. Anexo 2 – Concentração proteica e Taxa de secreção de saliva

## p) Análise Estatística da Concentração Proteica

(amostras centrifugadas, no período pós-colocação de implantes):

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Proteinaugml is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,426	Retain the null hypothesis.

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

Tabela 7 – Valores obtidos para a concentração de proteína nos diferentes grupos.

	Grupo		
	Controlo	Soro	Leptina
[proteína] µg/ml	1115,0	818,5	906,6
DesvPad	693,0	275,0	828,5
Erro Padrão	245,0	97,2	292,9

## q) Análise Estatística da taxa de secreção de saliva:

Descriptives								
Volume								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Controlo	8	1,3762	0,1767	0,0624	1,2285	1,5240	1,0922	1,6011
Soro	9	1,3977	0,2086	0,0695	1,2373	1,5580	1,1749	1,8731
Leptina	7	1,4208	0,2028	0,0766	1,2331	1,60847	1,2011	1,7003
Total	24	1,3973	0,18896	0,0385	1,3175	1,47710	1,0922	1,8731

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Volume						
Tukey HSD						
(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
controlo	soro	-0,0214	0,0956	0,973	-0,2625	0,2196
	leptina	-0,0445	0,1018	0,900	-0,3013	0,2122
soro	controlo	0,0214	0,0956	0,973	-0,2196	0,2625
	leptina	-0,0231	0,0992	0,971	-0,2731	0,2269
leptina	controlo	0,0445	0,1018	0,900	-0,2122	0,3013
	soro	0,0231	0,0992	0,971	-0,2269	0,2731

Tabela 8 – valores obtidos para a taxa de secreção de saliva (µg/ml).

	Controlo	Soro	Leptina

Taxa secreção de saliva (µg/ml)	0,138	0,140	0,142
DesvPad	0,018	0,021	0,020
Erro Padrão	0,006	0,007	0,008

## U. Anexo 3 – SDS PAGE

## r) Análise estatística do SDS PAGE:

Multiple Comparisons							
Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
@1A	Controlo	Soro	-3,900000	2,702468	,427	-15,19285	7,39285
		Leptina	-,050000	2,702468	1,000	-11,34285	11,24285
	Soro	Controlo	3,900000	2,702468	,427	-7,39285	15,19285
		Leptina	3,850000	2,702468	,435	-7,44285	15,14285
	Leptina	Controlo	,050000	2,702468	1,000	-11,24285	11,34285
		Soro	-3,850000	2,702468	,435	-15,14285	7,44285
A	Controlo	Soro	-,512292	,899812	,838	-2,82063	1,79605
		Leptina	-1,040833	,961939	,538	-3,50855	1,42688
	Soro	Controlo	,512292	,899812	,838	-1,79605	2,82063
		Leptina	-,528542	,899812	,829	-2,83688	1,77980
	Leptina	Controlo	1,040833	,961939	,538	-1,42688	3,50855
		Soro	,528542	,899812	,829	-1,77980	2,83688
B	Controlo	Soro	,244167	,681356	,932	-1,57360	2,06193
		Leptina	-,093500	,708086	,990	-1,98258	1,79558
	Soro	Controlo	-,244167	,681356	,932	-2,06193	1,57360
		Leptina	-,337667	,639168	,859	-2,04288	1,36755
	Leptina	Controlo	,093500	,708086	,990	-1,79558	1,98258
		Soro	,337667	,639168	,859	-1,36755	2,04288
C	Controlo	Soro	-,056875	,615581	,995	-1,63606	1,52231
		Leptina	-,680833	,658083	,566	-2,36905	1,00739
	Soro	Controlo	,056875	,615581	,995	-1,52231	1,63606
		Leptina	-,623958	,615581	,579	-2,20314	,95523
	Leptina	Controlo	,680833	,658083	,566	-1,00739	2,36905
		Soro	,623958	,615581	,579	-,95523	2,20314
D	Controlo	Soro	-,687500	1,120509	,816	-3,71383	2,33883
		Leptina	-,433750	1,022880	,906	-3,19640	2,32890
	Soro	Controlo	,687500	1,120509	,816	-2,33883	3,71383
		Leptina	,253750	1,022880	,967	-2,50890	3,01640
	Leptina	Controlo	,433750	1,022880	,906	-2,32890	3,19640
		Soro	-,253750	1,022880	,967	-3,01640	2,50890
E	Controlo	Soro	8,213625	6,576718	,446	-8,99949	25,42674
		Leptina	13,619250	7,738803	,219	-6,63537	33,87387
	Soro	Controlo	-8,213625	6,576718	,446	-25,42674	8,99949
		Leptina	5,405625	7,064528	,730	-13,08423	23,89548
	Leptina	Controlo	-13,619250	7,738803	,219	-33,87387	6,63537
		Soro	-5,405625	7,064528	,730	-23,89548	13,08423
G	Controlo	Soro	-1,084167	4,201230	,964	-11,86182	9,69349
		Leptina	-6,414167	4,491304	,349	-17,93597	5,10763
	Soro	Controlo	1,084167	4,201230	,964	-9,69349	11,86182

	Leptina	Leptina	-5,330000	4,201230	,431	-16,10766	5,44766
		Controlo	6,414167	4,491304	,349	-5,10763	17,93597
		soro	5,330000	4,201230	,431	-5,44766	16,10766
H	Controlo	Soro	1,626607	2,515487	,798	-5,08437	8,33758
		Leptina	6,527500	2,837852	,094	-1,04350	14,09850
	Soro	Controlo	-1,626607	2,515487	,798	-8,33758	5,08437
		Leptina	4,900893	2,515487	,168	-1,81008	11,61187
	Leptina	Controlo	-6,527500	2,837852	,094	-14,09850	1,04350
		Soro	-4,900893	2,515487	,168	-11,61187	1,81008
I	Controlo	Soro	-1,242500	3,537894	,935	-10,58409	8,09909
		Leptina	-6,672083	3,955486	,247	-17,11630	3,77213
	Soro	Controlo	1,242500	3,537894	,935	-8,09909	10,58409
		Leptina	-5,429583	3,955486	,383	-15,87380	5,01463
	Leptina	Controlo	6,672083	3,955486	,247	-3,77213	17,11630
		Soro	5,429583	3,955486	,383	-5,01463	15,87380
J	Controlo	Soro	-1,856042	1,834570	,580	-6,56237	2,85028
		Leptina	-2,330833	1,961237	,476	-7,36211	2,70044
	Soro	Controlo	1,856042	1,834570	,580	-2,85028	6,56237
		Leptina	-,474792	1,834570	,964	-5,18112	4,23153
	Leptina	Controlo	2,330833	1,961237	,476	-2,70044	7,36211
		Soro	,474792	1,834570	,964	-4,23153	5,18112

Descriptives									
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
@1A	controlo	2	4,25000	1,767767	1,250000	-11,63276	20,13276	3,000	5,500
	soro	2	8,15000	4,313351	3,050000	-30,60392	46,90392	5,100	11,200
	leptina	2	4,30000	,424264	,300000	,48814	8,11186	4,000	4,600
	Total	6	5,56667	2,895974	1,182277	2,52753	8,60581	3,000	11,200
A	controlo	6	4,75083	1,898874	,775212	2,75809	6,74358	1,960	7,295
	soro	8	5,26313	1,511898	,534537	3,99915	6,52710	3,130	7,300
	leptina	6	5,79167	1,622482	,662375	4,08898	7,49436	3,515	7,555
	Total	20	5,26800	1,629369	,364338	4,50543	6,03057	1,960	7,555
B	controlo	4	2,80250	1,196951	,598475	,89788	4,70712	1,460	4,000
	soro	6	2,55833	,506218	,206663	2,02709	3,08958	1,840	3,300
	leptina	5	2,89600	1,395611	,624136	1,16312	4,62888	1,500	4,520
	Total	15	2,73600	,989421	,255467	2,18808	3,28392	1,460	4,520
C	controlo	6	3,14000	1,464773	,597991	1,60281	4,67719	1,730	5,890
	soro	8	3,19688	,615716	,217689	2,68212	3,71163	1,790	3,700
	leptina	6	3,82083	1,319486	,538678	2,43612	5,20555	2,350	5,510
	Total	20	3,36700	1,120697	,250595	2,84250	3,89150	1,730	5,890
D	controlo	4	4,22125	2,196013	1,098006	,72690	7,71560	1,600	6,885
	soro	4	4,90875	,929035	,464518	3,43045	6,38705	4,040	6,200
	leptina	6	4,65500	1,453626	,593441	3,12951	6,18049	2,200	6,160
	Total	14	4,60357	1,483109	,396378	3,74725	5,45989	1,600	6,885
E	controlo	5	29,21300	13,697074	6,125518	12,20584	46,22016	10,000	47,150
	soro	8	20,99938	12,417170	4,390133	10,61836	31,38039	7,500	40,975
	leptina	4	15,59375	3,340318	1,670159	10,27856	20,90894	11,240	18,900
	Total	17	22,14324	11,976993	2,904847	15,98523	28,30124	7,500	47,150
G	controlo	6	22,50333	8,891530	3,629952	13,17224	31,83442	11,920	36,890
	soro	8	23,58750	7,275793	2,572381	17,50478	29,67022	13,580	33,600
	leptina	6	28,91750	7,251286	2,960325	21,30774	36,52726	19,500	37,900

	Total	20	24,86125	7,860024	1,757555	21,18265	28,53985	11,920	37,900
H	controle	4	13,93375	4,901924	2,450962	6,13370	21,73380	9,800	21,040
	soro	7	12,30714	4,149885	1,568509	8,46914	16,14515	6,400	17,515
	leptina	4	7,40625	2,440339	1,220170	3,52313	11,28937	4,830	10,700
	Total	15	11,43400	4,539543	1,172105	8,92008	13,94792	4,830	21,040
I	controle	6	12,93917	7,589710	3,098486	4,97425	20,90408	4,490	23,965
	soro	6	14,18167	5,037485	2,056545	8,89515	19,46818	6,900	20,300
	leptina	4	19,61125	4,941367	2,470683	11,74843	27,47407	13,050	25,000
	Total	16	15,07313	6,338350	1,584588	11,69566	18,45059	4,490	25,000
J	controle	6	6,91083	1,546830	,631491	5,28753	8,53413	4,300	9,060
	soro	8	8,76688	4,565560	1,614169	4,94997	12,58378	,000	15,600
	leptina	6	9,24167	2,767500	1,129827	6,33735	12,14598	5,100	13,500
	Total	20	8,35250	3,361992	,751764	6,77904	9,92596	,000	15,600
C1	controle	1	3,50000	.	.	.	.	3,500	3,500
	soro	1	4,30000	.	.	.	.	4,300	4,300
	leptina	3	5,22000	1,393090	,804301	1,75937	8,68063	3,950	6,710
	Total	5	4,69200	1,254221	,560905	3,13468	6,24932	3,500	6,710
C2	controle	1	3,40000	.	.	.	.	3,400	3,400
	soro	1	2,80000	.	.	.	.	2,800	2,800
	leptina	1	4,80000	.	.	.	.	4,800	4,800
	Total	3	3,66667	1,026320	,592546	1,11715	6,21619	2,800	4,800
D1	controle	0	.	.	.	.	.	.	.
	soro	1	3,60000	.	.	.	.	3,600	3,600
	leptina	1	4,20000	.	.	.	.	4,200	4,200
	Total	2	3,90000	,424264	,300000	,08814	7,71186	3,600	4,200
G1	controle	3	10,54667	,440492	,254318	9,45242	11,64091	10,050	10,890
	soro	2	7,35000	5,161880	3,650000	-39,02765	53,72765	3,700	11,000
	leptina	2	7,41000	,650538	,460000	1,56515	13,25485	6,950	7,870
	Total	7	8,73714	2,727952	1,031069	6,21421	11,26008	3,700	11,000
H1	controle	2	4,65000	,494975	,350000	,20283	9,09717	4,300	5,000
	soro	1	12,40000	.	.	.	.	12,400	12,400
	leptina	2	4,95000	,919239	,650000	-3,30903	13,20903	4,300	5,600
	Total	5	6,32000	3,441947	1,539286	2,04626	10,59374	4,300	12,400
H2	controle	1	3,80000	.	.	.	.	3,800	3,800
	soro	0	.	.	.	.	.	.	.
	leptina	1	3,40000	.	.	.	.	3,400	3,400
	Total	2	3,60000	,282843	,200000	1,05876	6,14124	3,400	3,800
H3	controle	3	5,53333	1,721434	,993870	1,25706	9,80961	3,600	6,900
	soro	0	.	.	.	.	.	.	.
	leptina	3	6,26500	2,508520	1,448295	,03349	12,49651	3,500	8,395
	Total	6	5,89917	1,965453	,802393	3,83655	7,96178	3,500	8,395
H4	controle	0	.	.	.	.	.	.	.
	soro	2	5,95000	,353553	,250000	2,77345	9,12655	5,700	6,200
	leptina	1	6,15000	.	.	.	.	6,150	6,150
	Total	3	6,01667	,275379	,158990	5,33259	6,70074	5,700	6,200
J1	controle	1	3,70000	.	.	.	.	3,700	3,700
	soro	1	4,65000	.	.	.	.	4,650	4,650
	leptina	1	4,40000	.	.	.	.	4,400	4,400
	Total	3	4,25000	,492443	,284312	3,02670	5,47330	3,700	4,650
K	controle	2	2,85000	,353553	,250000	-,32655	6,02655	2,600	3,100
	soro	2	5,55000	3,040559	2,150000	-21,76834	32,86834	3,400	7,700
	leptina	4	3,61250	1,519767	,759883	1,19421	6,03079	2,400	5,800
	Total	8	3,90625	1,862387	,658453	2,34926	5,46324	2,400	7,700

Fazendo one-way ANOVA para as bandas que apresentam distribuição normal:

Multiple Comparisons							
Tukey HSD							
Dependent Variable	(I) Grupo	(J) Grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
A	control	soro	-,860833	,929110	,631	-3,23207	1,51041
		leptina	-1,040833	1,017789	,573	-3,63840	1,55673
	soro	control	,860833	,929110	,631	-1,51041	3,23207
		leptina	-,180000	,929110	,980	-2,55124	2,19124
	leptina	control	1,040833	1,017789	,573	-1,55673	3,63840
		soro	,180000	,929110	,980	-2,19124	2,55124
B	control	soro	-,248333	,819037	,951	-2,33865	1,84198
		leptina	-,545000	,897210	,818	-2,83483	1,74483
	soro	control	,248333	,819037	,951	-1,84198	2,33865
		leptina	-,296667	,819037	,931	-2,38698	1,79365
	leptina	control	,545000	,897210	,818	-1,74483	2,83483
		soro	,296667	,819037	,931	-1,79365	2,38698
E	control	soro	5,678056	7,126046	,710	-12,50878	23,86489
		leptina	13,948333	7,806192	,202	-5,97434	33,87101
	soro	control	-5,678056	7,126046	,710	-23,86489	12,50878
		leptina	8,270278	7,126046	,491	-9,91655	26,45711
	leptina	control	-13,948333	7,806192	,202	-33,87101	5,97434
		soro	-8,270278	7,126046	,491	-26,45711	9,91655
G	control	soro	-1,563333	4,016351	,920	-11,81372	8,68705
		leptina	-6,414167	4,399692	,334	-17,64290	4,81457
	soro	control	1,563333	4,016351	,920	-8,68705	11,81372
		leptina	-4,850833	4,016351	,464	-15,10122	5,39955
	leptina	control	6,414167	4,399692	,334	-4,81457	17,64290
		soro	4,850833	4,016351	,464	-5,39955	15,10122
H	control	soro	-,283056	3,426696	,996	-9,02854	8,46243
		leptina	4,351667	3,753758	,492	-5,22854	13,93187
	soro	control	,283056	3,426696	,996	-8,46243	9,02854
		leptina	4,634722	3,426696	,386	-4,11077	13,38021
	leptina	control	-4,351667	3,753758	,492	-13,93187	5,22854
		soro	-4,634722	3,426696	,386	-13,38021	4,11077
I	control	soro	-,604167	5,430699	,993	-14,46420	13,25586
		leptina	-,135000	5,949033	1,000	-15,31790	15,04790
	soro	control	,604167	5,430699	,993	-13,25586	14,46420
		leptina	,469167	5,430699	,996	-13,39086	14,32920
	leptina	control	,135000	5,949033	1,000	-15,04790	15,31790
		soro	-,469167	5,430699	,996	-14,32920	13,39086
J	control	soro	-,881944	2,020296	,901	-6,03807	4,27418
		leptina	-2,330833	2,213123	,554	-7,97908	3,31742
	soro	control	,881944	2,020296	,901	-4,27418	6,03807
		leptina	-1,448889	2,020296	,757	-6,60501	3,70724
	leptina	control	2,330833	2,213123	,554	-3,31742	7,97908
		soro	1,448889	2,020296	,757	-3,70724	6,60501

Para a maior parte das bandas a distribuição não é normal, utilizou-se testes não paramétricos – Kruskal Wallis (a tabela refere-se a todas as bandas, mesmo aquelas que apresentam distribuição normal).

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of @1A is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,913	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of A is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,576	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of B is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,798	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of C is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,550	Retain the null hypothesis.
5	The distribution of C1 is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,209	Retain the null hypothesis.
7	The distribution of D is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,207	Retain the null hypothesis.
9	The distribution of E is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,361	Retain the null hypothesis.
12	The distribution of G is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,261	Retain the null hypothesis.
13	The distribution of G1 is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,506	Retain the null hypothesis.
15	The distribution of H is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,288	Retain the null hypothesis.
16	The distribution of H1 is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,635	Retain the null hypothesis.
18	The distribution of H3 is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,055	Retain the null hypothesis.
20	The distribution of I is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,973	Retain the null hypothesis.
21	The distribution of J is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,332	Retain the null hypothesis.
23	The distribution of K is the same across categories of Grupo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,750	Retain the null hypothesis.

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

s) Géis SDS PAGE

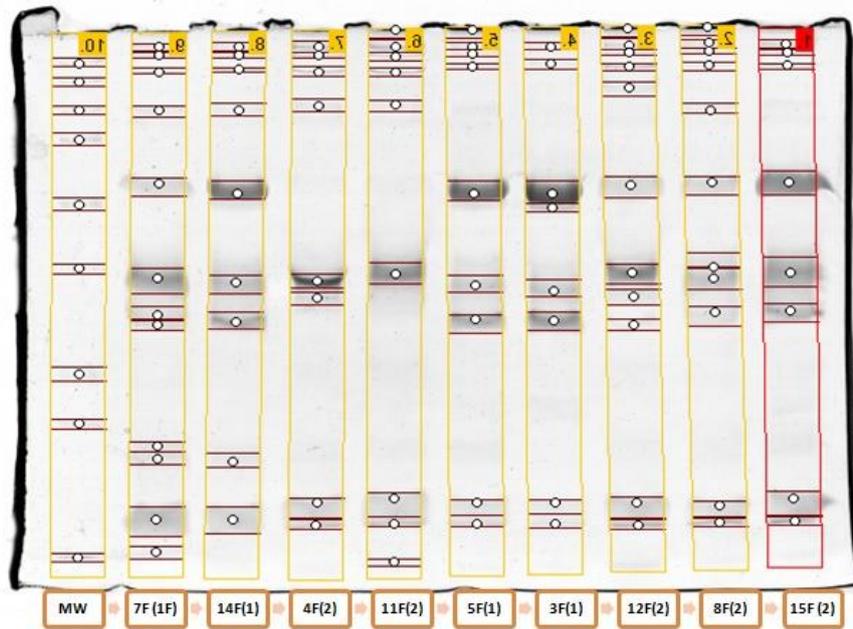


Figura 29 – Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas.

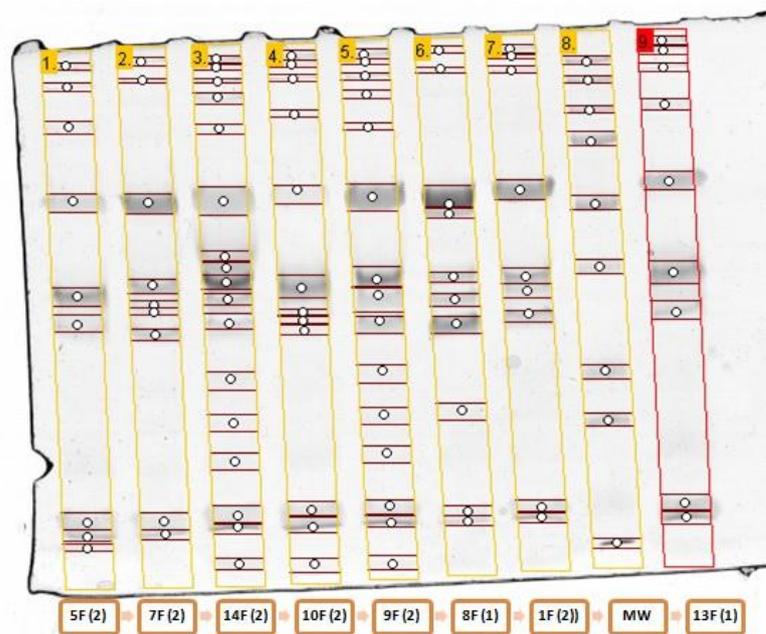


Figura 30 - Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas.

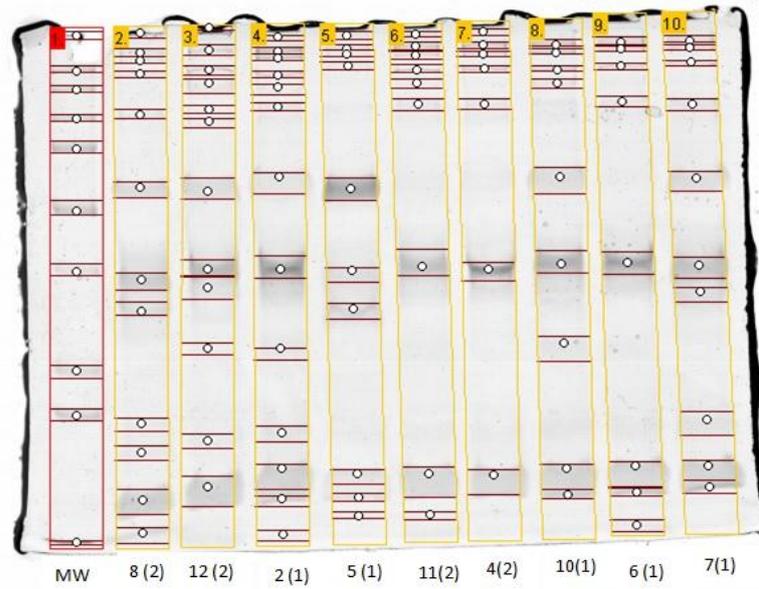


Figura 31 - Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas.

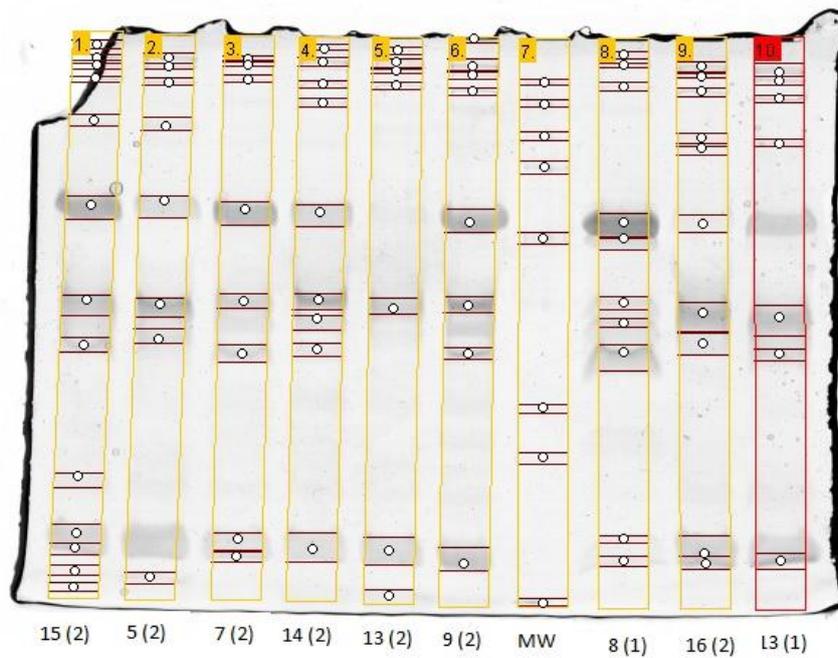


Figura 32 - Gel obtido com as amostras de saliva nas duas fases, com as bandas identificadas.

## V. Anexo 4 – Eletroforese Bi – dimensional

Para os spots cuja distribuição dos valores de % de volume é normal, foi feita uma análise paramétrica, usando o teste T de student:

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
S0	E.V.N.A.	,008	,932	,419	5	,692	,137	,327	-,704	,979
	E.V.N.A.			,415	4,291	,698	,137	,330	-,756	1,031
S1	E.V.N.A.	,202	,672	-1,270	5	,260	-,228	,179	-,689	,233
	E.V.N.A.			-1,271	4,472	,266	-,228	,179	-,706	,250
S2	E.V.N.A.	1,374	,294	-1,287	5	,254	-1,447	1,124	-4,337	1,443
	E.V.N.A.			-1,143	2,591	,347	-1,447	1,265	-5,858	2,964
S3	E.V.N.A.	6,361	,053	-1,716	5	,147	-1,227	,7151	-3,065	,6109
	E.V.N.A.			-1,471	2,209	,268	-1,227	,834	-4,511	2,056
S4	E.V.N.A.	,404	,553	-,652	5	,543	-,361	,555	-1,788	1,065
	E.V.N.A.			-,695	4,989	,518	-,361	,520	-1,701	,977
S5	E.V.N.A.	7,923	,037	,447	5	,673	,018	,041	-,087	,124
	E.V.N.A.			,490	4,753	,646	,018	,037	-,080	,116
S6	E.V.N.A.	3,338	,127	,617	5	,564	,082	,133	-,261	,426
	E.V.N.A.			,553	2,695	,623	,082	,149	-,424	,589
S7	E.V.N.A.	4,719	,082	1,528	5	,187	,915	,599	-,625	2,456
	E.V.N.A.			1,727	4,133	,157	,915	,530	-,538	2,370
S8	E.V.N.A.	5,840	,060	-,474	5	,655	-,476	1,005	-3,060	2,107
	E.V.N.A.			-,409	2,279	,718	-,476	1,164	-4,942	3,989
S9	E.V.N.A.	3,762	,110	-,711	5	,509	-1,112	1,565	-5,137	2,911
	E.V.N.A.			-,622	2,427	,587	-1,112	1,787	-7,642	5,416

*E. V. N. A. – Equal variances not assumed*

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
S10	E.V.N.A.	9,223	,029	-,492	5	,644	-,391	,796	-2,439	1,656
				-,423	2,250	,709	-,391	,925	-3,979	3,196
S11	E.V.N.A.	2,920	,148	,502	5	,637	,170	,339	-,701	1,042
				,453	2,781	,684	,170	,376	-1,081	1,421
S14	E.V.N.A.	,945	,376	-,719	5	,505	-1,327	1,847	-6,076	3,421
				-,661	3,057	,555	-1,327	2,007	-7,649	4,994
S16	E.V.N.A.	1,099	,343	1,258	5	,264	,672	,534	-,701	2,045
				1,380	4,714	,229	,672	,486	-,602	1,946
S18	E.V.N.A.	13,006	,015	,034	5	,974	,068	2,020	-5,126	5,262
				,038	4,196	,971	,068	1,793	-4,819	4,956
S19	E.V.N.A.	2,310	,189	-,045	5	,966	-,013	,295	-,771	,745
				-,040	2,630	,971	-,013	,331	-1,155	1,129
S20	E.V.N.A.	,271	,625	,274	5	,795	,169	,617	-1,417	1,756
				,286	4,950	,787	,169	,592	-1,358	1,697
S22	E.V.N.A.	,848	,399	,898	5	,410	,520	,579	-,968	2,008
				,992	4,615	,370	,520	,524	-,862	1,903
S23	E.V.N.A.	6,340	,053	,336	5	,751	,206	,615	-1,375	1,788
				,290	2,290	,796	,206	,712	-2,513	2,926
S24	E.V.N.A.	,003	,959	,912	5	,404	,304	,334	-,554	1,163
				,896	4,161	,419	,304	,339	-,624	1,234
S25	E.V.N.A.	1,249	,314	-,625	5	,559	-,079	,127	-,406	,247
				-,583	3,265	,598	-,079	,136	-,494	,335
S28	E.V.N.A.	1,082	,346	,391	5	,712	,061	,157	-,343	,467
				,359	2,991	,744	,061	,172	-,487	,610
S29	E.V.N.A.	10,518	,023	1,111	5	,317	,292	,263	-,384	,969
				1,272	3,827	,275	,292	,230	-,357	,942
S30	E.V.N.A.	1,671	,253	-1,449	5	,207	-,881	,608	-2,444	,682
				-1,274	2,479	,309	-,881	,691	-3,367	1,605
S32	E.V.N.A.	3,561	,118	-3,421	5	,019	-1,206	,352	-2,112	-,299
				-2,912	2,145	,093	-1,206	,414	-2,878	,465
S33	E.V.N.A.	2,070	,210	2,732	5	,041	1,233	,451	,072	2,394
				3,115	3,920	,037	1,233	,395	,125	2,341
S34	E.V.N.A.	1,230	,318	,380	5	,720	,069	,182	-,399	,538
				,418	4,660	,694	,069	,165	-,366	,505
S36	E.V.N.A.	3,402	,124	-1,484	5	,198	-,305	,205	-,835	,223
				-1,260	2,125	,328	-,305	,242	-1,292	,681
S37	E.V.N.A.	13,807	,014	-,422	5	,691	-,067	,159	-,478	,343
				-,356	2,059	,755	-,067	,189	-,861	,726
S38	E.V.N.A.	2,035	,213	-1,087	5	,327	-,442	,407	-1,489	,604
				-1,229	4,130	,285	-,442	,360	-1,430	,545
S40	E.V.N.A.	,059	,817	-3,367	5	,020	-,406	,120	-,716	-,096
				-3,453	4,812	,019	-,406	,117	-,712	-,100
S41	E.V.N.A.	,847	,400	-3,861	5	,012	-,752	,195	-1,254	-,251
				-4,214	4,793	,009	-,752	,178	-1,218	-,287
S42	E.V.N.A.	,012	,916	-,474	5	,655	-,365	,770	-2,346	1,615
				-,481	4,662	,652	-,365	,760	-2,363	1,632
S43	E.V.N.A.	2,144	,203	-,478	5	,653	-,083	,174	-,532	,365
				-,425	2,599	,704	-,083	,196	-,767	,600

S46	E.V.N.A.	,476	,521	,043	5	,967	,0197	,458	-1,159	1,199
				,040	3,359	,970	,0197	,489	-1,446	1,486
S48	E.V.N.A.	,356	,577	,154	5	,884	,083	,541	-1,307	1,474
				,163	5,000	,877	,083	,512	-1,232	1,399
S49	E.V.N.A.	1,869	,230	,452	5	,670	,064	,142	-,301	,429
				,508	4,242	,637	,064	,126	-,278	,407
S50	E.V.N.A.	1,992	,217	,093	5	,930	,011	,128	-,317	,341
				,104	4,337	,922	,011	,114	-,296	,320
S52	E.V.N.A.	1,524	,272	,739	5	,493	,936	1,267	-2,322	4,195
				,823	4,456	,452	,936	1,138	-2,100	3,974
S54	E.V.N.A.	7,613	,040	1,830	5	,127	,246	,134	-,099	,592
				2,028	4,539	,104	,246	,121	-,075	,568
S55	E.V.N.A.	,940	,377	,566	5	,596	,128	,226	-,455	,711
				,628	4,528	,561	,128	,204	-,414	,671
S57	E.V.N.A.	4,051	,100	,579	5	,588	,087	,151	-,301	,476
				,615	4,997	,566	,087	,142	-,278	,454
S58	E.V.N.A.	4,463	,088	1,139	5	,306	,436	,383	-,548	1,421
				,997	2,424	,407	,436	,437	-1,163	2,036
S59	E.V.N.A.	1,492	,276	-,409	5	,699	-,469	1,148	-3,421	2,482
				-,361	2,506	,747	-,469	1,302	-5,115	4,176
S61	E.V.N.A.	1,656	,254	,467	5	,660	,056	,120	-,252	,365
				,528	4,091	,625	,056	,106	-,236	,348
S63	E.V.N.A.	2,321	,188	,751	5	,487	1,241	1,653	-3,008	5,491
				,871	3,483	,440	1,241	1,424	-2,957	5,440
S64	E.V.N.A.	,014	,912	,525	5	,622	,050	,096	-,197	,298
				,523	4,395	,626	,050	,096	-,209	,310
S68	E.V.N.A.	3,175	,135	-1,593	5	,172	-,268	,168	-,702	,164
				-1,379	2,307	,286	-,268	,194	-1,008	,471
S75	E.V.N.A.	3,489	,121	1,341	5	,238	1,671	1,246	-1,532	4,876
				1,575	3,191	,208	1,671	1,061	-1,596	4,939
S76	E.V.N.A.	4,484	,088	1,980	5	,105	4,336	2,190	-1,294	9,968
				2,337	3,056	,100	4,336	1,855	-1,508	10,181
S77	E.V.N.A.	,270	,626	1,290	5	,253	1,540	1,194	-1,528	4,610
				1,307	4,656	,252	1,540	1,178	-1,557	4,638
S78	E.V.N.A.	3,152	,136	-,059	5	,955	-,032	,553	-1,455	1,390
				-,053	2,798	,961	-,032	,613	-2,065	2,000
S81	E.V.N.A.	4,354	,091	-2,629	5	,047	-,180	,068	-,357	-,004
				-2,325	2,538	,118	-,180	,077	-,456	,094
S82	E.V.N.A.	,116	,747	-3,041	5	,029	-,191	,063	-,353	-,029
				-3,176	4,964	,025	-,191	,060	-,347	-,036
S83	E.V.N.A.	,101	,764	-2,731	5	,041	-,269	,098	-,523	-,015
				-2,808	4,839	,039	-,269	,096	-,519	-,020
S86	E.V.N.A.	5,101	,073	-,660	5	,538	-,341	,517	-1,671	,988
				-,583	2,522	,608	-,341	,585	-2,422	1,739
S90	E.V.N.A.	2,430	,180	-1,230	5	,273	-,170	,138	-,528	,186
				-1,119	2,892	,348	-,170	,152	-,667	,325
S91	E.V.N.A.	2,308	,189	-2,881	5	,035	-,207	,071	-,392	-,022
				-2,624	2,914	,081	-,207	,079	-,463	,048
S92	E.V.N.A.	7,515	,041	,485	5	,649	,047	,098	-,206	,302
				,562	3,481	,608	,047	,085	-,203	,299
S98	E.V.N.A.	11,615	,019	-1,906	5	,115	-,119	,062	-,279	,041
				-1,627	2,168	,236	-,119	,073	-,411	,173
S99	E.V.N.A.	3,838	,107	-1,766	5	,138	-,201	,113	-,494	,091

				-1,499	2,119	,266	-,201	,134	-,748	,346
S101	E.V.N.A.	2,206	,198	-1,099	5	,322	-,117	,107	-,392	,157
				-,989	2,743	,402	-,117	,118	-,517	,281
S102	E.V.N.A.	3,199	,134	-9,344	5	,000	-,150	,016	-,191	-,109
				-8,400	2,738	,005	-,150	,0179	-,210	-,090

Para os spots cujos valores de % de volume não apresentavam distribuição normal foi feita uma análise não paramétrica, sendo o teste utilizado o Mann-Whitney:

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of S12 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,629 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of S13 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of S15 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of S17 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
5	The distribution of S21 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,229 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
6	The distribution of S26 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,114 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
7	The distribution of S31 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
8	The distribution of S35 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
9	The distribution of S39 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
10	The distribution of S44 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,229 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.

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

<sup>1</sup>Exact significance is displayed for this test.

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
11	The distribution of S45 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
12	The distribution of S47 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,629 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
13	The distribution of S51 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
14	The distribution of S53 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
15	The distribution of S56 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,629 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
16	The distribution of S60 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,857 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
17	The distribution of S62 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
18	The distribution of S65 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.

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

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
19	The distribution of S67 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,629 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
20	The distribution of S72 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,000 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
21	The distribution of S74 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,857 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
22	The distribution of S80 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
23	The distribution of S93 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,629 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
24	The distribution of S97 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,229 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
25	The distribution of S100 is the same across categories of grupo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,400 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.

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

<sup>1</sup>Exact significance is displayed for this test.

- t) Determinação dos pontos isoelétricos dos *spots* proteicos observados em géis 2-DE para tiras (IPG strips) de 13 cm, gama de pH 3-10 não linear

O ponto isoelétrico aparente de cada *spot* foi determinado através da medição do comprimento da tira e da posição da tira no gel de segunda dimensão, tendo em conta a largura deste. Seguidamente, através da posição de cada *spot* (como percentage da largura do gel) foi feita interpolação gráfica (*figura 33*).

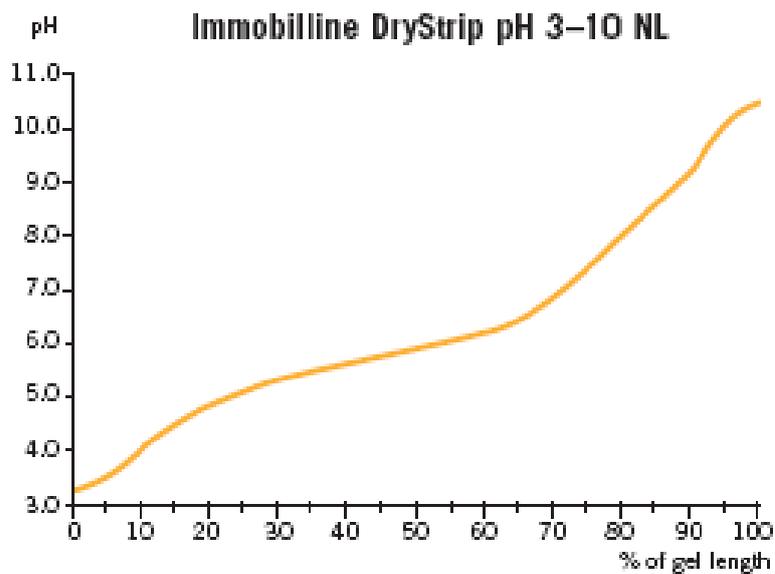


Figura 33 – Gráfico de gradiente de pH. O gradiente de pH apresentado nesta figura é válido para condições próximas de 20°C em 8M ureia, usando IPGbuffer 3-10 NL. (Immobiline DryStrip gels Data file, 18-1177-60 AB, 2004-06; GE-Healthcare).

## W. Anexo 5 – Expressão das diferentes bandas na técnica SDS-PAGE

Tabela 9 - Expressão para cada banda individual de cada animal, dentro de cada grupo

Banda	Controlo									
	2(1)	3(1)	15(2)	4(2)	7(2)	9(2)	Media	DesvPad	Erro Padrão	%variação
1A	3	0	0	5,5	0	0	1,42	2,33	0,95	164,66
A	5,7	1,96	3,2	7,295	5,4	4,95	4,75	1,90	0,78	39,97
B	4	0	1,46	3,6	0	2,15	1,87	1,72	0,70	91,99
C	3,5	2,52	1,73	5,89	2,8	2,4	3,14	1,46	0,60	46,65
C1	3,5	0	0	0	0	3	1,08	1,69	0,69	155,61
D	3,7	0	4,7	6,885	0	1,6	2,81	2,76	1,13	98,25
E	10	47,15	29,965	0	34,9	24,05	24,34	17,10	6,98	70,23
G	27	11,92	24,16	36,89	17,8	18,9	22,78	8,68	3,54	38,10
G1	0	0	0	10,89	12	10,7	5,60	6,15	2,51	109,83
H	0	21,04	12,245	0	12,65	9,8	9,29	8,14	3,32	87,58
H1	5	0	0	0	0	4,3	1,55	2,41	0,98	155,58
H3	6,9	0	6,1	0	0	3,6	2,77	3,22	1,31	116,40
I	18,3	4,49	14,63	23,965	11,05	5,2	12,94	7,59	3,10	58,66
J	6,5	4,3	7,255	9,06	6,95	7,4	6,91	1,55	0,63	22,38
K	3,1	0	2,6	0	0	3	1,45	1,60	0,65	110,15

Banda	Soro										Media	DesvPad	Erro Padrão	% variação
	5(1)	10(1)	14(1)	1(2)	16(2)	5(2)	8(2)	10(2)	13(2) §					
1A	5,1	0	0	0	0	0	11,2	0	6,3	2,51	4,11	1,37	163,67	
A	3,13	6	3,54	4,7	6,2	7,3	4,535	6,7	8,4	5,61	1,51	0,50	26,94	
B	2,56	0	1,84	2,2	2,6	0	2,85	3,3	3,7	2,12	1,26	0,42	59,49	
C	2,96	3,6	1,79	3,3	3,7	3,35	3,275	3,6	6	3,51	0,62	0,21	17,55	
C1	0	4,3	0	0	0	0	0	0	0	0,48	1,52	0,51	318,20	
D	0	0	4,04	0	4,5	6,2	4,895	0	0	2,18	2,69	0,90	123,46	
E	40,975	16,4	32,61	32,1	7,5	15,15	13,76	9,5	0	18,67	12,42	4,14	66,52	
G	13,58	25,8	17,13	18,3	0	25,8	21,59	33,6	27,9	20,41	10,03	3,34	49,16	
G1		0	0	11	12,4	0	0	3,7	0	3,39	5,53	1,96	163,27	
H	17,515	0	17,38	12,3	12,4	6,4	11,755	8,4	0	9,57	5,80	1,93	60,64	
H1	0	12,4	0	0	0	0	0	0	0	1,38	4,38	1,46	318,20	
H3	0	0	5,7	0	0	0	6,2	0	0	1,32	2,76	0,92	208,55	
I	8,77	20,3	15,97	6,9	15,9	20,7	16,72	9,3	36,8	16,82	5,33	1,78	31,66	
J	5,945	7,2	0	9,2	10,8	11	10,39	15,6	0	7,79	4,57	1,52	58,59	
K	0	0	0	0	0	0	7,7	3,4	10,9	2,44	2,81	0,94	115,14	

§ - Animal retirado da análise.

Banda	Leptina										
	6(1)	7(1)	8(1) §	13(1)	11(2)	12(2)	14(2)	Media	DesvPad	Erro Padrão	% variação
1A	0	0	3,1	0	4,6	0	4	1,67	2,13	0,80	127,42
A	7,3	3,515	2,35	6,65	7,555	5,13	4,6	5,30	1,97	0,75	37,19
B	0	1,86	0	4,25	4,52	2,35	1,5	2,07	1,82	0,69	87,76
C	4,7	2,39	2,55	3,35	5,51	4,625	2,35	3,64	1,30	0,49	35,63
C1	0	0	0	0	5	6,71	3,95	2,24	2,90	1,10	129,80
D	6	4,81	0	4	6,16	4,76	2,2	3,99	2,20	0,83	55,23
E	0	11,24	40,45	18,9	0	14,885	17,35	14,69	13,74	5,19	93,50
G	37,9	26,175	7,6	27,55	37,265	25,115	19,5	25,87	10,43	3,94	40,30
G1	0	0	6,95	0	0	7,87	6,95	3,11	3,89	1,47	125,11
H	0	7,295	20,95	10,7	0	4,83	6,8	7,23	7,20	2,72	99,61
H1	0	0	0	0	0	5,6	4,3	1,41	2,44	0,92	172,83
H3	0	9,275	0	0	0	6,9	3,5	2,81	3,89	1,47	138,24
I	25	19,71	3,1	10,75	24,2	20,685	13,05	16,64	8,00	3,02	48,05
J	8,5	10,6	4,2	13,5	9,29	8,46	5,1	8,52	3,16	1,20	37,14
K	5,8	3,44	0	0	2,81	0	2,4	2,06	2,21	0,84	107,05

§ - Animal retirado da análise.