BRUNA DE OLIVEIRA PERESTRELO

**Potencial antioxidante do chá de camomila nas glândulas salivares e sua
influência no estado glicêmico de ratos diabéticos**

São Paulo

2018

BRUNA DE OLIVEIRA PERESTRELO

**Potencial antioxidante do chá de camomila nas glândulas salivares e sua
influência no estado glicêmico de ratos diabéticos**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Perestrelo, Bruna de Oliveira.

Potencial antioxidante do chá de camomila nas glândulas salivares e sua influência no estado glicêmico de ratos diabéticos / Bruna de Oliveira Perestrelo; orientador Fernando Neves Nogueira. -- São Paulo, 2018.

89p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Glândulas salivares. 2. Diabetes mellitus. 3. Estresse oxidativo. 4. Chá de camomila. I. Nogueira, Fernando Neves. II. Título.

Perestrelo BO. Potencial antioxidante do chá de camomila nas glândulas salivares, e sua influência no estado glicêmico de ratos diabéticos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2018

Banca examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico esta dissertação a Deus e minha avó Neide Ferrari de Oliveira (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pois sei que sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Ricardo e Roseli que me ensinaram valores que nunca vou esquecer, que me propuseram tudo que é necessário para que eu pudesse realizar meus sonhos, que devo minha vida e todas as minhas conquistas. Pude aprender com vocês a importância dos estudos e os mais belos valores de vida. Agradeço todo incentivo, confiança e apoio que me deram durante toda a minha caminhada. Agradeço a minha irmã Mariana que além de tudo é minha companheira de jornada. Juntas, aprendemos e dividimos nossos conhecimentos e compartilho minhas melhores lembranças de infância. Agradeço a toda minha família e amigos, pelo apoio e torcida. Ao meu namorado Maycon Milanez, por todo carinho, amor, amizade, companhia, proteção, incentivo, por ter transformado minha vida desde que chegou trazendo muita alegria. Obrigada pelos conselhos, por ser o melhor parceiro de jornada e estar ao meu lado fazendo tudo que é possível para me ajudar. Você é uma inspiração.

A meu orientador Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, com o qual tive a oportunidade de aprender e desenvolver habilidades. Agradeço a oportunidade, através de sua dedicação e confiança consegui avançar. Sou eternamente grata pelo apoio e aprendizado. Muito obrigada pelas sugestões, pela atenção e paciência. Tive a oportunidade de crescer muito, considero esse período na USP como um dos períodos que mais aprendi e desenvolvi, devo isso a você. Muito obrigada!

A Dra. Polliane Moraes de Carvalho, muito obrigada por todos os valiosos conselhos, por dividir sua experiência comigo, pelo apoio, por acreditar no meu trabalho e pela ajuda infinitas vezes. Você foi fundamental para a realização de cada etapa. Obrigada pela sua dedicação, responsabilidade e comprometimento com este trabalho. Construímos uma amizade que espero que dure para sempre. Te agradeço de todo coração, pela sua paciência e carinho. Conte sempre comigo.

Ao laboratório da Profª Drª. Lila M. Oyama por ter me recebido com tanto carinho. Obrigada aos técnicos Paloma e Valter, a doce Ana Lúcia, aos alunos da pós-graduação. Á todos muito obrigada!!!! Especialmente a professora Lila

que me recebeu da melhor maneira possível, sempre disposta a ajudar da melhor forma. Colaboração fundamental! Muito obrigada pela valiosa contribuição nesse projeto.

Aos técnicos Douglas Nesadal e Elisangela Chein, por toda ajuda tão fundamental, pelo apoio, incentivo, conselhos e pelo carinho. Muito obrigada, vocês foram fundamentais, junto a vocês pude aprender muito! Obrigada pela paciência e me auxiliar nos momentos mais difíceis.

Aos meus colegas Ana, Regiane, Gabriela e Vitor, que em tantos momentos me ajudaram, me ensinaram e compartilharam conhecimentos comigo. Espero da mesma forma ter contribuído com a carreira acadêmica de vocês. Obrigada por tudo.

Aos funcionários do departamento de Biologia Oral e Biomateriais, pela colaboração em todos os momentos que precisei. Obrigada Rosinha, por me acudir nos momentos mais difíceis, sempre com muito carinho.

À Coordenação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (CAPES), pela bolsa concedida.

“Todo o que pede recebe, o que busca encontra.”

Lucas 11:10

RESUMO

Perestrelo BO. Potencial antioxidante do chá de camomila nas glândulas salivares e sua influência no estado glicêmico de ratos diabéticos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da administração do chá de camomila durante 21 dias sobre parâmetros antioxidantes e estresse oxidativo das glândulas parótida e submandibular. Bem como o efeito do consumo do chá no transporte de glicose do fígado e possíveis alterações sistêmicas. Os grupos estudados foram divididos em controle não tratado (C), controle tratado com chá de camomila (CC), diabético não tratado (DM) e diabético tratado com chá de camomila (DMC). A indução do diabetes nos grupos DM e DMC foi realizada com injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/Kg de peso corporal). No 7º dia experimental, os animais do grupo CC e DMC iniciaram o tratamento com o chá de camomila. Foram avaliados os sistemas antioxidantes enzimáticos por meio da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e da via não enzimática pelo total antioxidante (TAS). O estresse oxidativo foi avaliado por meio da quantificação de malondialdeído (MDA). Além disso foram analisados os níveis de insulina séricos, glicemia, peso e consumo hídrico e alimentar. A via de transporte de glicose foi estudada por meio da avaliação da expressão e quantificação das proteínas AKT e AMPK. Os resultados obtidos confirmam o potencial hipoglicemiante do chá de camomila, bem como sua ação no controle da polidipsia. O chá não alterou os níveis de insulina além disso provocou uma redução da expressão da p-AMPK. O tratamento com chá ocasionou um aumento nos valores da atividade da GPx e CAT tanto na glândula parótida como na submandibular. No entanto, para o TAS o chá provocou aumento apenas na glândula submandibular. Na glândula parótida o chá diminuiu a peroxidação lipídica. Os resultados obtidos confirmam o potencial antioxidante do chá de camomila na glândula parótida dos animais diabéticos após tratamento. Conclusão: O tratamento com o chá de camomila aponta como sendo promissor na prevenção dos danos oxidativos presentes no diabetes

mellitus, tanto nas glândulas salivares através da redução do MDA, quanto sistemicamente pelo seu potencial hipoglicemiante.

Palavras-chave: Glândulas salivares. Diabetes. Estresse oxidativo. Chá de camomila.

ABSTRACT

Perestrelo BO. Antioxidant potential of chamomile tea in the salivary glands and its influence on the glycemic state of diabetic rats [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

The present study aimed to evaluate the influence of the administration of chamomile tea for 21 days on antioxidant parameters and oxidative stress of the parotid and submandibular glands. As well as the effect of tea consumption on the transport of glucose from the liver and possible systemic alterations. The groups studied were divided into untreated control (C), control treated with chamomile tea (CC), untreated diabetic (DM) and diabetic treated with chamomile tea (DMC). The induction of diabetes in the DM and DMC groups was performed with intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg / kg body weight). On the 7th experimental day, the CC and DMC animals started treatment with chamomile tea. The enzymatic antioxidant systems were evaluated through the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) and non-enzymatic pathway by total antioxidant (SAT). Oxidative stress was evaluated by the quantification of malondialdehyde (MDA). Serum insulin levels, glycemia, weight, and water and food intake were also analyzed. The glucose transport pathway was studied by evaluating the expression and quantification of AKT and AMPK proteins. The results confirm the hypoglycemic potential of chamomile tea, as well as its action in the control of polydipsia. The tea did not alter insulin levels, in addition it caused a reduction of p-AMPK expression. Treatment with tea caused an increase in the values of GPx and CAT activity in both the parotid gland and the submandibular gland. However, for TAS the tea caused only increase in the submandibular gland. In the parotid gland the tea decreased lipid peroxidation. The results confirm the antioxidant potential of chamomile tea in the parotid gland of diabetic animals after treatment. Conclusion: Treatment with chamomile tea is shown to be promising in preventing the oxidative damage present in diabetes mellitus, both in the salivary glands through the reduction of MDA and systemically due to its hypoglycemic potential.

Keywords: Salivary glands. Diabetes. Oxidative stress. Chamomile tea.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Desenho experimental. No 1º, o DM foi induzido nos animais do grupo DM e DMC. Setenta e duas horas após a indução aferimos a glicemia em jejum com glicôsimetro. No 7º dia, os animais do grupo CC e DMC começaram o tratamento com o chá de camomila substituindo a água. No 30º, a glicemia em jejum foi aferida com glicômetro, e foi realizada a coleta de sangue e demais tecidos de todos os animais. 49
- Figura 5.1 - Glicemia em jejum (mg de glicose/dL de sangue), aferida com glicosímetro 72 horas após a indução do diabetes e no 30º dia. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). ($p < 0.0001$ C final vs DM final, $* p < 0.0001$ vs C, $+ p < 0.0001$ DMC inicial vs DMC final, $\# p < 0.0001$ DM final vs DMC final). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way pós teste Tuckey).) 60
- Figura 5.2 - Massa corpórea (g). Os animais foram pesados no início do tratamento e no 30º dia (eutanásia). Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). ($*p < 0.0001$ C inicial vs C final; $*p < 0.0001$ CC inicial vs CC final; $*p < 0.0001$ DM inicial vs DM final. ($\#p < 0.0001$ C final vs DM final, $*p < 0.0001$ CC vs DMC). Grupo C n= 8, grupo DM n=10, grupo CC n=8 e grupo DMC n= 10. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. (ANOVA, one way pos teste Tuckey)..... 62
- Figura 5.3 - – A ingestão de líquidos (Figura A) e (Figura B) consumo de ração nos grupos Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- Ingestão de ração (g/Kg/24h) ($* p < 0.0001$ C vs DM, $\# p < 0.0001$ CC final vs DMC final). C n=10, DM n= 10, CC n=6 e DMC n= 7. B- A ingestão de líquidos (mL/Kg/24h), água para os grupos C e DM e chá de camomila para os grupos CC e DMC. ($* p < 0.0001$ C vs DM, $+ p < 0.0001$ DM vs DMC, $\# p < 0.0001$ CC vs DMC). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 7. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way pós teste Tuckey)..... 63

Figura 5.4 - A atividade enzimática da SOD, GPx, GR e CAT na glândula submandibular. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- A atividade da enzima superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína) C n=10, DM n= 10, grupo, CC n=8 e DMC n= 10. B- Atividade da glutathione peroxidase (U de GPx/mg de proteína), a (* p< 0.01 vs C, CC e DM). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 10. C- Atividade da enzima CAT (U de CAT/mg de proteína) (* p< 0.0001 vs C, * p< 0.001 vs DM, * p< 0.05 vs CC). C n=10, DM n= 9, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média ± DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*). 65

Figura 5.5 - A- Valores de total antioxidante (nmol/mg de proteína), na glândula submandibular. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). (&p< 0.05 C vs DM, #p< 0.0001 C vs DMC, *p< 0.01 DMC vs DM, +p< 0.01 CC vs DMC). C n=9, DM n= 7, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média ± DP. B- Valores de MDA uM/mg de proteína não encontramos diferença estatisticamente significativa. C n=8, grupo DM n= 9, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média ± DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*)..... 66

Figura 5.6 - A atividade enzimática da SOD, GPx, GR e CAT na glândula parótida. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- A atividade da enzima superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína) C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 10. B- Atividade da glutathione peroxidase (U de GPx/mg de proteína) (* p< 0.001 vs C, * p< 0.001 vs DM, * p< 0.05 vs CC). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 7. C- Atividade da enzima CAT (U de CAT/mg de proteína) (* p< 0.001 DMC vs C). C n=9, DM n= 8, CC n=6 e DMC n= 9. Os valores são expressos em média ± DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*)..... 68

Figura 5.7 - Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- Valores de total antioxidante (nmol/mg de proteína), na glândula parótida, não apresentam diferença estatisticamente significativa. C n=9, DM n= 10, CC n=9 e DMC n= 8. Os valores são expressos em média ± DP. B- Valores de MDA (uM/mg de proteína). (* p< 0.004 vs

DMC). C n=7, DM n= 7, CC n=9 e DMC) n= 7. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*).69

Figura 5.8 - Análise das proteínas p- AMPK, e AMPK por meio de Western Blot. Em cima expressão da proteína p- AMPK (63 KDa), AMPK total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado. Da esquerda para a direita: controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). Em baixo análise quantitativa da proteína p- AMPK (63 KDa), AMPK total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado, cada banda representa um animal diferente. CC n=6, DMC n= 6, C n=6 e DM n= 6. (* $p < 0.005$ p-AMPK DMC vs C). Os valores são expressos em média $\pm$ DP. 70

Figura 5.9 - Análise das proteínas AKT e p-AKT por meio de Western Blot. Em cima expressão da proteína p- AKT (63 KDa), AKT total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado. Da esquerda para a direita: controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). Em baixo análise quantitativa da proteína p- AKT (63 KDa), AKT total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado, cada banda representa um animal diferente. CC n=6, DMC n= 6, C n=6 e DM n= 6. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Anticorpos utilizados no Western Blot. seus pesos moleculares e diluições..... 57

Tabela 5.1 - Níveis de insulina (ng/mL) presente no soro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). Além disso, os níveis de insulina não foram detectados no grupo DM e DMC. C n=5, DM n= 8, DMC n= 8 e CC n=5. Os valores são expressos em média $\pm$ DP..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ	microlitros
ATP	Adenosina trifosfato
AGE	Advanced glycation end-product
CAT	Catalase
DM	Diabetes mellitus
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GLUT2	Glucose transporter 2
GPx	Glutathione peroxidase
kDa	quilo Dalton
mg/dL	miligrama por decilitro
mL/min	mililitros por minuto
mmol/L	milimol por litro
nm	nanômetros
μg	micrograma
μL/min	microlitros por minuto
μM/mL	micromol por mililitros
MDA	malondialdeído
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TAS	Total antioxidante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA GLICOSE E DIABETES MELLITUS	27
2.2	DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO	33
2.3	SISTEMA ANTIOXIDANTE E CHÁ DE CAMOMILA	37
2.4	GLÂNDULA SALIVARES E IMPLICAÇÕES ORAIS DO DM	39
3	PROPOSIÇÃO	45
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	ANIMAIS	47
4.2	INDUÇÃO DO DIABETES	48
4.3	ADMINISTRAÇÃO DO CHÁ	48
4.4	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	49
4.5	ANÁLISES	50
4.5.1	Análises em amostras de sangue	50
4.5.1.1	Determinação da Glicemia	50
4.5.2	Análises em amostras de soro	51
4.5.2.1	Determinação da concentração de insulina	51
4.5.3	Análises em amostras de glândula salivar	51
4.5.3.1	Preparo das amostras de glândula salivar	52
4.5.3.2	Análise do total antioxidante (TAS)	52
4.5.3.3	Análise da superóxido dismutase (SOD)	53
4.5.3.4	Análise da glutathione peroxidase (GPx)	53
4.5.3.5	Análise da catalase (CAT)	53
4.5.3.6	Quantificação do MDA	54
4.5.3.7	Determinação de proteína total	54
4.5.4	Análises em amostras de fígado	54
4.5.4.1	Preparo das amostras de fígado para Western Blot	55
4.5.4.2	Determinação de proteína total	55
4.5.4.3	Preparo para o SDS-PAGE	55
4.5.5	Western Blot	56

4.5.5.1 “Imunoblotting”	56
4.5.5.2 Revelação das membranas.....	57
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5 RESULTADOS	59
5.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	59
5.2 CONSUMO DE RAÇÃO E ÁGUA/CHÁ DE CAMOMILA	62
5.3 PARÂMETROS ANTIOXIDANTES DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR.....	64
5.4 PARÂMETROS ANTIOXIDANTES DA GLÂNDULA PARÓTIDA	67
5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AMPK/AKT NO FÍGADO	69
6 DISCUSSÃO	73
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

A glicose é a principal fonte de energia para a maioria dos organismos e tem papel central no metabolismo e homeostasia celular. Na regulação fisiológica desse carboidrato dois hormônios são fundamentais: o glucagon e a insulina. Em indivíduos saudáveis, após uma refeição a secreção de insulina é estimulada e a de glucagon é inibida por uma ação combinada de hiperglicemia e hiperinsulinemia (1, 2). A insulina desempenha papel importante no armazenamento de energia. O efeito básico da ausência da insulina sobre o metabolismo da glicose impede a captação eficiente e utilização desse carboidrato, provocando aumento das concentrações de glicose no sangue, levando a um quadro de hiperglicemia (3). O diabetes mellitus (DM) é um grupo de desordens metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica decorrente de defeitos na secreção de insulina, na sua ação ou ambos. Está associada a longo prazo a disfunção e falência em vários órgãos, especialmente olhos, rins, coração e vasos sanguíneos. Os principais sintomas são polifagia, polidipsia e poliúria (4).

Indivíduos com DM tem aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) um tipo de radical livre, devido a exposição a níveis elevados de glicose durante muito tempo induzindo o estresse oxidativo, com papel central na patogênese e progressão dessa doença e de suas complicações (5). Os radicais livres, como as EROs são inevitavelmente gerados pelo organismo em condições normais, como subproduto de vários processos bioquímicos. Entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais e podem reagir com as principais classes de biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídeos, como resultado dessa interação podem ocorrer alterações estruturais, bem como anormalidades funcionais (6, 7). A interação entre as EROs com os lipídeos, causam alterações peroxidativas que resultam em elevação dos produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA). O estresse oxidativo é uma condição em que ocorre desequilíbrio entre a produção de EROs e sua remoção pelos sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático (8).

Conceitualmente, um agente antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações quando comparadas com o substrato oxidável retarda significativamente ou previne a sua oxidação. Desta maneira, a utilização de agentes antioxidantes torna-se importantes ferramentas no tratamento do estresse

oxidativo, e consequentemente, dos danos causados pela DM (9). Nosso sistema antioxidante é dividido em duas vias: enzimática e não enzimática. A primeira inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). A segunda inclui agentes antioxidantes como a camomila, que vem sendo estudada devido os efeitos protetores dessa planta contra complicações da hiperglicemia. A camomila tem ainda a propriedade de aumentar os níveis das enzimas antioxidantes e diminuir a peroxidação lipídica (10).

Outras complicações associadas com DM são as alterações bucais, as quais podem afetar também as glândulas salivares parótida e submandibular (11). Estas constituem um grupo de glândulas exócrinas localizadas na região da boca, as quais vertem seus produtos de secreção para a cavidade oral, formando, no conjunto, a saliva. Esta é composta por uma variedade de proteínas, glicoproteínas e eletrólitos importante para a manutenção da saúde oral (12). Outras complicações orais associadas ao diabetes, incluem xerostomia (sensação de boca seca), e/ou hipossalivação, além de problemas periodontais (13).

O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito do chá de camomila sobre parâmetros antioxidantes e estresse oxidativo das glândulas parótida e submandibular. Visamos ainda estudar o transporte de glicose no fígado e as possíveis alterações sistêmicas causadas pelo uso do chá de camomila nesse modelo experimental, tais como: glicemia, níveis de insulina, peso corporal e consumo hídrico e alimentar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tópicos abordados na revisão de literatura são referências teóricas acerca do tema bem como estudos relacionados.

2.1 REGULAÇÃO FISIOLÓGICA DA GLICOSE E O DIABETES MELLITUS

Os carboidratos são cruciais para o desenvolvimento e funcionamento de todos os organismos, não apenas como fontes de energia, mas também como moléculas ricas em informações (DNA). São compostos formados por átomos de carbono ligados à grupos hidroxila. Uma propriedade importante que possibilita o desenvolvimento de suas numerosas funções é a enorme diversidade estrutural possível dentro dessa classe de moléculas. Os carboidratos simples são chamados de monossacarídeos, são aldeídos ou cetonas que têm dois ou mais grupos hidroxila. Ademais, de acordo com seu número de átomos de carbono podem ser designados trioses, tetroses, pentoses, hexoses ou heptoses. Os monossacarídeos mais conhecidos são as hexoses, como a glicose e a frutose (14, 15).

A glicose é a principal fonte de energia para os organismos eucariontes e tem papel central no metabolismo e homeostasia celular. Quase todas as células são capazes de atender às suas demandas energéticas a partir desse açúcar, e algumas são estreitamente dependentes desse carboidrato, como as hemácias e as células do tecido nervoso. No caso das hemácias isso se deve ao fato dessas células não apresentarem mitocôndria para o metabolismo aeróbico; já o encéfalo apresenta uma barreira para entrada de lipídeos, o cérebro por sua vez é dependente de um contínuo fornecimento de glicose e baixas concentrações sanguíneas podem causar convulsões, perda de consciência e dano celular irreversível. Por outro lado, níveis elevados de glicose no sangue tem efeito prejudicial e é referido como “glucotoxicidade” que pode levar a disfunção e falência em vários órgãos (1, 2).

Na regulação fisiológica do metabolismo da glicose dois hormônios são fundamentais: a insulina e o glucagon. O glucagon estimula glicogenólise no fígado para aumentar os níveis de glicose no sangue. A insulina é uma proteína pequena,

formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto (15). É um hormônio anabolizante que atua no armazenamento de substâncias energéticas e no crescimento e diferenciação celular diminuindo a produção de glicose hepática e aumentando a entrada desse carboidrato nas células musculares e nas células adiposas (16).

No estado de jejum, a homeostasia da glicose depende do equilíbrio entre a produção da glicose hepática e a utilização pelos principais tecidos dependentes de insulina, como fígado, tecido adiposo/muscular e pelos não dependentes de insulina como cérebro e rins. No caso de elevadas concentrações de carboidratos, a insulina faz com que seja armazenado sob a forma de glicogênio, principalmente no fígado e nos músculos. Além disso todo o excesso de carboidratos que não pode ser armazenado como glicogênio é convertido sob estímulo da insulina, em gordura e armazenado no tecido adiposo. Além do efeito primário que este hormônio causa na homeostasia da glicose, ele também promove uma série de outros eventos celulares como regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo de lipídeos, transcrição de genes, aumento dos processos de transdução do RNA mensageiro e síntese de DNA. No caso das proteínas, a insulina exerce efeito direto na promoção da captação de aminoácidos pelas células e na sua conversão. Além disso, inibe o catabolismo das proteínas que já se encontram nas células (17).

A insulina é secretada pelo pâncreas que é formado por dois tipos principais de tecidos: ácinos, que secretam o suco digestivo no duodeno e as Ilhotas de Langerhans que incluem 4 tipos de células principais: α , β , δ , e PP. Os principais produtos secretados dessas células são o glucagon, insulina, somatostatina e polipéptido pancreático, respectivamente. As células α constituem 25% de todas as células da ilhota e secretam o hormônio glucagon principalmente em resposta à hipoglicemia. As células β constituem cerca de 60% do total de células e secretam insulina em resposta a níveis elevados de glicose além de responderem a outras substâncias como o glucagon e a acetilcolina. A célula δ representam 10 % de todas as células e secretam o hormônio somatostatina em resposta à hipoglicemia. As células PP são encontradas em menor número e secretam o polipéptido pancreático em resposta a hipoglicemia e secretina (16).

Para exercer seus efeitos sobre as células-alvo, a insulina em primeiro lugar se liga e ativa um receptor proteico, situado na membrana plasmática. O receptor da insulina é uma combinação de quatro subunidades que se mantêm unidas por meio

de ligações dissulfeto: duas subunidades α (situados do lado externo da membrana celular) e duas β (atravessam a membrana, projetando-se no citoplasma celular). Devido a ligação existente entre as subunidades α e β , a insulina ao se ligar à subunidade α , provoca a autofosforilação das subunidades β projetadas para o interior da célula. A autofosforilação ativa a tirosina quinase (enzima ativada) que irá causar a ativação ou inativação de algumas enzimas intracelulares, dirigindo assim o metabolismo dentro da célula, para então produzir os efeitos desejáveis sobre os carboidratos, lipídeos e proteínas. Tais ações resultarão, principalmente, em aumento da captação de glicose pelas células do organismo, especialmente as células musculares e adiposas, provocado pelo aumento da permeabilidade celular devido à estimulação da síntese de transportadores de glicose (GLUTs) e sua translocação através da membrana plasmática (18, 19). Um grupo de proteínas, pertencentes à família de proteínas AKT (AKT1, AKT2 e AKT3), também chamadas de proteínas quinase B, é composta por proteínas quinase de serina/tirosina que desempenham importante papel na sinalização celular de mamíferos. A fosforilação da AKT, que ocorre pela ação da proteína PI3-K, resulta em várias ações intracelulares da insulina, como, por exemplo, o aumento do transporte de glicose através da estimulação de vesículas contendo GLUT4 do citoplasma para a membrana celular em músculo e tecido adiposo. A proteína AKT medeia as ações da insulina no transporte de glicose, síntese de glicogênio, síntese proteica, lipogênese e inibição da gliconeogênese hepática. Sendo considerada uma proteína-chave para estimular a captação de glicose ou síntese de glicogênio (20).

O efeito básico da ausência da insulina ou a resistência à ação da insulina sobre o metabolismo da glicose é impedir a captação eficiente e utilização da glicose, pela maioria das células do organismo. Como resultado, a concentração glicêmica aumenta, levando a um quadro clínico denominado hiperglicemia, que contribui para diminuir a homeostasia da glicose. Apesar de tal aumento a utilização celular do referido carboidrato reduz ainda mais e a utilização dos lipídeos e das proteínas como fontes de energia, por outro lado, aumenta. Portanto, uma alteração na ação fisiológica da insulina pode afetar o metabolismo de todos os nutrientes, este é o quadro encontrado no diabetes mellitus (DM) e está associado a grandes alterações nas respostas fisiológicas mencionadas anteriormente (3, 18).

O DM é um distúrbio metabólico, de etiologia múltipla, caracterizada pela hiperglicemia crônica com distúrbio no metabolismo de carboidratos, gorduras e

proteínas, resultante de defeitos na secreção da insulina, sua ação, ou ambos. A hiperglicemia crônica no diabetes está associada, à longo prazo, a danos, disfunção e falência em vários órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (4).

Sendo um problema de saúde em todo o mundo, sua prevalência vem aumentando nos últimos anos. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (*International diabetes federativon* - IDF) existem 425 milhões de pessoas no mundo que vivem com a doença. A estimativa para 2045 é de 629 milhões de doentes. O DM é conhecido como um dos maiores problemas de saúde na América Latina. Dos cinco países com maior número de pessoas diagnosticadas, o Brasil lidera com mais de 13 milhões, uma prevalência de 8,7% da população maior de 18 anos (21).

Atualmente são três os testes recomendados para diagnóstico e acompanhamento do estado glicêmico de um indivíduo diabético; (a) teste de glicemia (concentração de glicose no sangue) em jejum (≥ 126) confirmado com a repetição do teste; (b) teste de glicemia casual (≥ 200) realizado a qualquer momento do dia associado a sintomas e o (c) teste de tolerância a glicose (>200) que consiste de duas coletas, sendo a primeira em jejum e a segunda após duas horas da ingestão de 75g de glicose. O Exame da hemoglobina glicada reflete uma média dos níveis glicêmicos por um período de 2-3 meses, além de ser indicado para o diagnóstico ($\geq 6,5\%$), é utilizado para monitoramento do tratamento (controle metabólico) (22).

O diabetes mellitus pode ser classificado principalmente em dois tipos. Diabetes tipo 1 e tipo 2. O primeiro, anteriormente denominado de diabetes juvenil ou diabetes insulino dependente, representa 5-10% das pessoas com diabetes e caracteriza-se pela deficiência absoluta de insulina, que inclui dois subtipos: imune-mediada e idiopática. Já o tipo 2, anteriormente denominado não insulina-dependente, representa cerca de 90-95% das pessoas com diabetes e caracteriza-se pela resistência à ação da insulina. Logo o organismo não consegue usá-la efetivamente. Existem ainda outros tipos de diabetes como a gestacional, desenvolvida durante a gravidez e que normalmente desaparece em seguida. As principais manifestações clínicas que ocorrem com o aumento da glicemia são polifagia, poliúria, polidipsia e o hálito cetônico que ocorre pela presença dos corpos cetônicos advindos do metabolismo de ácidos graxos. O aumento exacerbado dos corpos cetônicos no sangue causa um quadro de acidose, podendo levar o indivíduo ao coma, principalmente no diabetes tipo 1. Esse quadro se desenvolve da seguinte

maneira quando há falta de insulina e o organismo não consegue usar a glicose como fonte de energia, umas das alternativas encontradas para manter o funcionamento celular é utilizar os estoques de gordura para obter a energia necessária. Entretanto, o resultado desse processo leva ao acúmulo dos corpos cetônicos o que provocara uma acidez no sangue, que é extremamente desfavorável para o organismo, pois para a maioria das reações químicas que ocorrem nas nossas células dependem de uma faixa de pH muito estreita, ou seja, não pode variar muito (4, 22, 23).

O diabetes tipo 1 imune mediada é resultado de uma destruição celular por meio de um processo autoimune das células β do pâncreas, tem predisposição genética e pode estar relacionada a fatores ambientais ainda mal definidos. Nessa forma de diabetes a destruição das células β é bastante variável, sendo rápida em alguns indivíduos (principalmente em crianças) e lento em outros (principalmente adultos). Geralmente acomete crianças e adolescentes que podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Já os pacientes adultos podem manter uma função residual das células β suficiente para prevenir cetoacidose por muitos anos, porém o risco de desenvolver esse quadro aumenta se tais indivíduos em algum momento passem a se tornar dependentes do uso da insulina. Os pacientes raramente são obesos, entretanto a presença da obesidade não é incompatível com o diagnóstico. Algumas formas de diabetes tipo 1 não tem etiologia conhecida sendo, portanto, referidas como idiopática. Alguns desses pacientes tem insulinopenia permanente e são propensos a cetoacidose metabólica, contudo sem evidências de um processo autoimune (4, 22).

Em pacientes portadores de diabetes tipo 2 ocorre, pelo menos duas, deficiências fundamentais: (a) redução da sensibilidade à insulina no tecido muscular, adiposo e fígado e/ou (b) comprometimento da função das células β do pâncreas com redução progressiva da secreção de insulina resultando em hiperglicemia crônica. Embora sejam conhecidos diversos sinais, manifestações e sintomas da diabetes tipo 2, os mecanismos envolvidos na etiologia da doença ainda não estão totalmente esclarecidos, contudo é sabido que existe uma forte predisposição genética, maior do que no diabetes tipo 1 e que não ocorre processo de destruição autoimune das células β pancreáticas. Provavelmente ambos os fatores, genéticos e ambientais, estão envolvidos na patogênese desse tipo de diabetes. Frequentemente não é diagnosticada no início, isto porque a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e muitas vezes nos primeiros estágios não é grave o suficiente para que o paciente

perceba alguns dos sinais clássicos da doença, o que dificulta um diagnóstico precoce. Raramente a cetoacidose metabólica ocorre espontaneamente no diabetes tipo 2, quando observada está associada ao estresse ou infecção (3, 17).

O desenvolvimento da resistência à insulina e alterações no metabolismo da glicose é normalmente um processo gradual, que poderá levar a falência das células β com redução progressiva na secreção do respectivo hormônio, começando com excesso de ganho de peso ou obesidade. A resistência à insulina não está presente somente nos músculos e fígado (os principais responsáveis pela disposição de glicose após a ingestão de carboidratos) mas está presente também no tecido adiposo, nos rins, trato gastrointestinal, cérebro e nas próprias células β pancreáticas. No caso dos músculos múltiplas alterações contribuem para a resistência, entre elas podemos citar: defeitos na sinalização da insulina, nos transportadores de glicose, na fosforilação da glicose e na síntese de glicogênio. No fígado, a resistência à insulina, causa aumento da sensibilidade ao glucagon, elevação do fornecimento de substratos como ácido graxos, glicerol e aminoácidos, provocando aumento da gliconeogênese que é a responsável pela produção basal de insulina na hiperglicemia de jejum. Além disso, o fígado em si apresenta uma diminuição da captação de glicose. Concomitantemente a resistência insulínica muscular, hepática associadas ao aumento da reabsorção renal provocam alterações metabólicas contribuindo para o aumento da glicemia pós-prandial (3).

O transporte de glicose pode ser feito também por um mecanismo independente de insulina, mediado por uma proteína quinase ativada por AMP chamada AMPK. A contração muscular ativa aumenta a atividade da AMPK, estimulando o transporte de glicose. Um estudo com camundongos demonstrou que a atividade da via AMPK está reduzida no modelo animal com diabetes induzida, nesse trabalho o aumento da atividade de AMPK no fígado e no músculo foi responsável pelo aumento da expressão de GLUT 4 um transportador de glicose na membrana celular reduzindo a hiperglicemia nesses animais (24).

As alterações fisiopatológicas caracterizadas por disfunção das células β associada a resistência à insulina progressivamente dificultam o controle dos níveis glicêmicos. A hiperglicemia crônica é característica tanto do diabetes tipo 2 quanto do diabetes tipo 1 e é certamente um importante fator patogênico no desenvolvimento das alterações microvasculares na retina, glomérulo renal e nervos periféricos, provocam perda da visão, insuficiência renal e neuropatias respectivamente. A

diabetes também está associada a aceleração das complicações macrovasculares como aterosclerose que pode atingir artérias que fornecem o suprimento sanguíneo ao coração, cérebro e as extremidades inferiores. Além disso, os pacientes têm um risco maior de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) e amputação dos membros (25).

Tanto as complicações microvasculares como as macrovasculares estão fortemente relacionadas com o estresse oxidativo, que é induzido pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O termo estresse oxidativo é utilizado em circunstâncias de desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante endógena. Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos no aparecimento dessas complicações vasculares e são desencadeados durante a hiperglicemia através da formação das EROs entre elas o aumento do fluxo da via de formação do polioliol, aumento da produção de produtos finais da glicação avançada (advanced glycation ends products – AGE), ativação da proteína quinase C e auto-oxidação da glicose (25, 26).

2.2 DIABETES MELLITUS E O ESTRESSE OXIDATIVO

Conceitualmente as EROs são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons. As EROs são exemplos de radicais livres e além delas existem, as espécies reativas de nitrogênio (óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peroxinitrito), espécies reativas de enxofre (radical tiíla), espécies reativas de cloro (ácido hipocloroso), metais de transição (ferro, cobre, manganês) e as espécies reativas de carbono (27).

Todos os organismos, com exceção daqueles que são anaeróbicos ou aerotolerantes, necessitam de O₂ para a produção eficiente de energia (na forma de ATP), através da oxidação completa da molécula de glicose, podemos dividir esse processo em três etapas básicas: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa que acontecem em diferentes regiões da célula. Durante o ciclo de Krebs ocorre a

oxidação completa da glicose, que consiste na remoção dos elétrons desse carboidrato e transferência para a nicotinamida adenosina dinucleotídeo (NAD) e flavina adenosina dinucleotídeo (FAD) que se convertem em NADH e FADH₂ em seguida irão para a cadeia respiratória no interior da mitocôndria, a última etapa do metabolismo da glicose denominada fosforilação oxidativa. É com a energia desses elétrons que a cadeia produz ATP (14, 15).

A membrana interna da mitocôndria possui um sistema de complexos proteicos com função de transportar os elétrons, como os que foram retirados da glicose e transferidos para as coenzimas NADH e FADH₂. Esses elétrons são atraídos pelo oxigênio e passam por estes complexos. Nos organismos aeróbicos o oxigênio atua como receptor de elétrons e durante a respiração celular em condições normais recebe quatro elétrons e se reduz formando água. Porém, é observado que durante esta etapa existe um escape de elétrons que podem reagir diretamente com o O₂, formando ânion superóxido (O₂⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), quando o oxigênio recebe um ou dois elétrons respectivamente. O H₂O₂ pode se reduzir e formar o radical hidroxil (HO.) esses compostos são exemplos de (EROs) sendo a mitocôndria considerada a principal fonte geradora dessas espécies (14, 15, 25).

Os radicais livres como as EROs são inevitavelmente gerados pelo organismo em condições normais, como subproduto de vários processos bioquímicos como citado anteriormente no interior da mitocôndria. Sendo necessários para a manutenção do estado redox e quando em concentrações ideais garantem o bom funcionamento celular. Ademais, também estão envolvidos na sinalização intercelular, imunidade e defesa celular e síntese de substâncias biológicas (6, 7).

Entretanto, quando em excesso apresentam efeitos prejudiciais e podem reagir com as principais classes de biomoléculas, como proteínas, DNA e lipídeos, como resultado dessa interação podem ocorrer alterações estruturais, bem como anormalidades funcionais. ⁽²⁸⁾ Já foi verificado em estudos clínicos que indivíduos com DM tem aumento da geração de EROs. A exposição a níveis elevados de glicose durante muito tempo induz o estresse oxidativo, tendo papel central na patogênese e progressão dessa doença e de suas complicações (5, 28).

A interação entre as EROs com as macromoléculas biológicas como os lipídeos, causam alterações peroxidativas que resultam em elevação dos produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA). A interação das ERO com os ácidos graxos das membranas celulares altera a estrutura dos lipídios, causando

modificações biológicas e fisiológicas como a diminuição da fluidez e alteração da atividade de ligação entre a membrana, enzimas e receptores através da produção descontrolada de peróxidos de lipídios (8, 28, 29). Um estudo realizado com pacientes destacou a relação entre as EROs e os danos teciduais em patologias humanas como DM. Observou-se um maior conteúdo de MDA em diabéticos e uma correlação positiva foi encontrada com a hemoglobina glicada (HbA1c), mostrando que, à medida que a glicemia aumentava, a extensão da peroxidação lipídica também (30).

Na presença de um ambiente hiperglicêmico diversos fatores podem contribuir para uma maior geração de radicais livres no indivíduo diabético, que em altas concentrações podem reagir com diversas biomoléculas induzindo o estresse oxidativo e como citado anteriormente gerando danos como a peroxidação lipídica. Entre eles aumento do fluxo da via do poliol (25).

Nas condições fisiológicas a via do poliol é responsável por uma pequena parcela da conversão enzimática da glicose em sorbitol através da atividade da aldose redutase que participa da redução de aldeídos tóxicos para álcool. A nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) é necessária para atividade dessa enzima, e durante o estado hiperglicêmico ocorre um aumento do fluxo dessa via, e consequentemente maior utilização do NADPH, que é imprescindível para a atividade da glutatona, que na célula pode ser encontrada na sua forma reduzida (GSH) ou na sua forma oxidada (GSSG). A GSH atua na remoção dos radicais livres e após ser oxidada pode novamente sofrer redução com consumo do NADPH, portanto, a diminuição dessa coenzima provocara o aumento da geração EROs que não serão devidamente eliminadas, induzindo ou exacerbando o estresse oxidativo. Além disso o sorbitol é oxidado em frutose, agente responsável pela glicação (consiste em uma ligação covalente de carboidratos a um grupo proteico ou a um lipídeo sem atuação de uma enzima) de biomoléculas. Para que ocorra a reação de oxidação da frutose é necessário uso do (NAD⁺) gerando (NADH), que provoca uma alteração da razão NAD⁺: NADH. A alteração dessa razão deflagra consequências importantes para a célula como por exemplo, inibição da enzima gliceraldeído – 3- fosfato desidrogenase (GAPDH), que é uma enzima essencial na via glicolítica e atua catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3 – bifosfoglicerato na presença do NAD⁺ e do fosfato inorgânico. O NAD⁺ poderá estar em quantidade reduzida em função de ser utilizado em outras vias como da oxidação da frutose, provocando inibição e redução da atividade da GAPDH, em função disso essa enzima

fica em excesso ativando a via da proteína quinase C. A GAPDH, além disso pode também ser convertida em metilglioxal um precursor dos produtos de glicação avançada (AGE) outro mecanismo responsável pela geração de EROs (25, 31).

Por meio da geração de EROs, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou das interações com receptores celulares, os AGEs provocam respectivamente o estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios. Os efeitos patológicos estão relacionados à capacidade destes compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais de estruturas biológicas como citado anteriormente. A via de formação de AGEs inicia-se a partir da interação de um grupamento amino proveniente de proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos com um grupamento carbonílico presente em açúcares redutores como a glicose, formando a base de Schiff que é instável, e em seguida ocorrem rearranjos que são mais estáveis conhecidos como Produtos de Amadori que reagem e geram compostos altamente reativos que darão origem aos produtos da glicação avançada (AGE). Durante o estado hiperglicêmico temos a geração de importantes precursores para a formação de AGEs, como o metilglioxal formado pelo excesso de gliceraldeído 3 – fosfato em função da inibição da via glicolítica, o glioxal gerado a partir da auto-oxidação da glicose e o 3-deoniglicosona que surge do metabolismo da frutose (32, 33).

O acúmulo de gliceraldeído – 3 fosfato na célula fica em equilíbrio com o dihidroxiacetona fosfato (DAG), acaba sendo desviado para a síntese de lipídeos e síntese de diacilglicerol que um importante ativador da proteína quinase C que quando ativada fosforila substratos e altera a sinalização intracelular, podendo estar relacionada com uma série de alterações moleculares que facilitam a disfunção endotelial (34).

Conforme já exposto, pudemos demonstrar a presença do estresse oxidativo no DM, isto devido a exposição a níveis elevados de glicose durante um longo período, o que pode provocar a diminuição da capacidade de defesa endógena. No entanto, a fim de prevenir estes possíveis danos nosso organismo dispõe de mecanismos denominados sistemas antioxidantes (16, 25, 26, 31, 32, 34).

2.3 SISTEMA ANTIOXIDANTE E O CHÁ DE CAMOMILA

Conceitualmente, um agente antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações quando comparadas com o substrato oxidável retarda significativamente ou previne a sua oxidação. Nosso sistema antioxidante é composto por uma via enzimática e outra não enzimática (9).

O sistema antioxidante enzimático é composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). A SOD é responsável por catalisar a reação de dismutação de duas moléculas de ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. Está presente no citoplasma (CuZn-SOD) e na mitocôndria (Mn-SOD) em diferentes isoformas (7, 35). As seguintes enzimas são capazes de remover H_2O_2 : CAT e a GPx. A CAT está presente nos peroxissomas de vários tecidos e libera $NADP^+$ o que proporciona maior remoção do H_2O_2 pelo sistema glutathione peroxidase/redutase, isto porque a CAT contém moléculas de NADPH ligadas (36). A glutathione peroxidase (GPx), possui 5 isoformas identificadas, quatro delas dependentes de selênio e uma não dependente de selênio. Cerca de 2/3 está presente no citoplasma e 1/3 na mitocôndria. A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a (GSH) à (GSSG), removendo H_2O_2 , e formando água. Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxil, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa (10, 37).

Essas enzimas que compõem nosso sistema enzimático podem ser inativadas e conseqüentemente ter sua atividade diminuída, isto porque um ambiente hiperglicêmico é responsável por um aumento da glicação de proteínas, alterando suas características estruturais e função. (38). Dessa forma, terapias que possam eliminar, e/ou reduzir o estresse oxidativo são interessantes e a sua aplicação tem sido cada vez mais encorajada pela comunidade científica. Diversos agentes antioxidantes vêm sendo estudados como tratamento de doenças que resultam no estresse oxidativo, dentre eles as vitaminas C, E (39) e mais recentemente o chá de camomila (40).

Dentre as diversas variedades de camomila uma delas concentra um maior número de pesquisas devido suas propriedades medicinais e segundo as regras

internacionais de botânica é denominada *Chamomilla recutita* (L). No entanto, podemos encontrar trabalhos que citam outros sinônimos científicos como *Matricaria chamomilla* e *Matricaria recutita*. É uma das plantas medicinais mais estudadas e conhecidas do mundo. A parte usada com finalidade terapêutica são os capítulos florais, os quais possuem seus principais constituintes pertencentes a três classes químicas diferentes: sesquiterpenos, cumarinas e flavonoides. Dentre os componentes sesquiterpenos, que constituem o óleo essencial, abrangem α -bisabolol, chamazulene e α -farnesene. Os compostos polifenólicos incluem: cumarinas (herniarina, umbeliferona e esculetin) e flavonoides (apigenina, luteolina e quercetina). Além destes encontramos aminoácidos, ácidos graxos, sais minerais e ácidos orgânicos. Seus constituintes químicos possuem uma fração lipofílica composta pelos componentes do óleo essencial e cumarinas e/ou uma fração hidrofílica composta pelos flavonoides, aminoácidos e ácidos orgânicos. São os princípios ativos lipofílicos e hidrofílicos responsáveis pela atividade terapêutica da camomila (41).

Vários dos constituintes químicos ativos com potencial biológico da *Chamomilla recutita* (L). estão presentes no óleo essencial (0,4 -1,5%), os quais possuem atividade anti-inflamatória, antialérgica e antiespasmódica. Dentre eles, o chamuzulene formado sob altas temperaturas, possui reconhecida atividade anti-inflamatória, sendo potencializada na presença de outros constituintes do óleo como o α -bisabolol. O primeiro, além da referida ação, possui propriedades antibacterianas, antimicóticas e ação protetora das mucosas. Já o α -bisabolol possui ação antibacteriana, antifúngica, antipirética. Os flavonoides são responsáveis por 9% do seu peso seco e possuem propriedades anti-inflamatória e antiespasmódica. Juntamente com as cumarinas são solúveis em água quente (42).

Estudos confirmaram a eficácia do chá de camomila e de seus compostos ativos na modulação do estresse oxidativo associado com DM (40, 43-45). Além das propriedades já conhecidas citadas acima, alguns trabalhos estão correlacionando os componentes dessa planta com efeitos hipoglicemiantes e antioxidante associados à diminuição dos danos causados pelo DM, uma vez que tais compostos reduzem os níveis glicêmicos, diminuindo a geração de EROs através do aumento da atividade do sistema antioxidante em humanos (45, 46) e ratos por meio da eliminação dos radicais livres e diminuição da peroxidação lipídica. O esculetin e a quercetina são dois de seus compostos ativos os quais tem sido relacionado com a diminuição dos níveis de

glicemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). Estes atuam inibindo a α -glicosidase intestinal, que é responsável pela degradação do amido em glicose. Ao inibir a atividade dessa enzima provocam um retardo da digestão de carboidratos consequentemente reduzindo a glicemia pós-prandial (43). Ashokkumar et al. sugeriram que o esculetin exerce um efeito protetor no diabetes ao diminuir o estresse oxidativo mediado pela hiperglicemia (47).

Outros dois constituintes das flores da *Chamomilla recutita* (L). conhecidos como ácido clorogênico e ácido fenólico podem desacelerar a absorção de carboidratos pela inibição do transporte de glicose intestinal (43). (Panda e Kar indicaram que a apigenina, um dos componentes ativos da camomila, aumenta a insulina sérica diminuindo a glicemia em ratos diabéticos (48).

Estudos que utilizaram o extrato aquoso de camomila observaram que em ratos diabéticos induzidos por STZ, após a administração do chá apresentaram uma diminuição nos níveis de glicose, aumento dos níveis séricos de insulina, diminuição nos níveis séricos de MDA e aumento dos níveis das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx no soro e em um estudo em humanos foi observado aumento SOD e GPx no fígado e rim (40, 45).

Não é do nosso conhecimento qualquer estudo que avaliou o efeito do chá de camomila nos parâmetros antioxidantes de glândulas salivares. Os estudos indicam um aumento das enzimas antioxidantes SOD, GPx (49, 50) na glândula parótida e da CAT na glândula submandibular de ratos diabéticos induzidos por STZ (49).

2.4 GLÂNDULAS SALIVARES, SALIVA E IMPLICAÇÕES ORAIS DO DM

As glândulas salivares constituem um grupo de glândulas exócrinas localizadas na região da boca, as quais vertem seus produtos de secreção para a cavidade oral, formando, no conjunto, a saliva. Cada glândula salivar é constituída por elementos parenquimatosos revestidos e suportados por tecido conjuntivo. As estruturas do parênquima derivam do ectoderma, constituídas por unidades secretoras terminais e um sistema de ductos. O tecido conjuntivo, forma o estroma glandular que além de fornecer o suporte para o parênquima, contém os vasos sanguíneos e linfáticos, bem como os nervos que suprem a glândula. São classificadas em: glândulas salivares

maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) e glândulas salivares menores ou acessórias localizadas na submucosa oral, com exceção da gengiva e palato duro anterior. Todas as glândulas salivares desenvolvem-se de maneira semelhante. Esse processo ocorre entre 4 e 12 semanas de vida embrionária, sendo as parótidas as primeiras a se desenvolverem e as sublinguais e glândulas salivares menores as últimas (12, 51) .

A unidade funcional das glândulas salivares, denominada adenômero, é constituída pelas unidades secretoras terminais de fundo cego que se abrem em pequenos e curtos ductos (intercalares), que têm continuidade com ductos maiores (estriado), e esses, por sua vez, reúnem-se em ductos progressivamente de maior calibre (excretores), dos quais o último desemboca na cavidade oral (excretor terminal). As unidades secretoras terminais podem ser constituídas por células serosas, com forma esférica, unidades mucosas tendem a se arranjar formando tubulos. Todavia, há unidades secretoras nas quais se encontram células serosas dispostas em forma de semilua, envolvendo parcialmente as células mucosas. Também há outro tipo celular denominadas de células mioepiteliais, que embora, não sejam secretoras, localizam-se ao redor unidades secretoras terminais (12, 52).

Durante algum tempo os ductos foram considerados condutores, hoje sabe-se que também participam da composição do produto final. A secreção proveniente dos ductos intercalares é basicamente protéica e isotônica em relação ao plasma sanguíneo, com alta concentração de sódio (Na^+) e cloro (Cl^-) e baixa concentração de potássio (K^+). Após sua passagem pelos ductos extriados , a secreção torna-se hipotônica, com baixa concentração de Na^+ e Cl^- e alta concentração de K^+ . A secreção de todas as glândulas salivares, juntamente com outros elementos oriundos da mucosa e cavidade oral, constituem a saliva total (12).

As glândulas salivares principais (maiores) são responsáveis pela formação de aproximadamente 90% do volume total de saliva. As parótidas são as maiores glândulas salivares, sendo constituída por unidades secretoras terminais do tipo serosa produzindo uma saliva aquosa e rica em amilase. As células serosas das glândulas salivres não são serosas puras como no pâncreas que secreta além de íons e água, somente proteínas (enzimas), enquanto que no caso das glândulas salivares, a secreção contém um pequeno componente glicoprotéico por isso alguns autores consideram essas células de “seromucosas”. Normalmente contribuem com cerca de

25% do volume total de saliva não estimulada, porém, quando estimuladas, as parótidas produzem cerca de 50% do volume total de saliva (51) .

Já a submandibular é uma glândula mista em que predominam as unidades secretoras serosas em relação às mucosas, porém, ao contrário das parótidas, elas secretam uma saliva mais viscosa e rica em mucina, sendo responsáveis por cerca de 70% do total de saliva não estimulada. Por sua vez a glândula sublingual é predominantemente mucosa, com muitas semiluas serosas, produzem secreção viscosa e, estimuladas ou não, contribuem apenas um pouco para o volume da saliva total. As glândulas salivares menores estão presentes na mucosa que recobre todas as regiões da cavidade oral, com exceção da gengiva e da porção anterior do palato duro, são pequenas e possuem a característica de não terem uma cápsula muito bem definida. As suas unidades secretoras terminais estão em sua maioria entremeadas no tecido conjuntivo das mucosas de revestimento da boca, principalmente submucosa ou entre as fibras musculares da língua. A maior parte delas é constituída por unidades secretoras mucosas, a única exceção são as glândulas localizadas na base das papilas valadas, que são puramente serosas denominadas Von Ebner, desembocando no fundo do sulco, onde se localizam os botões gustativos. As demais são denominadas segundo a região em que estão localizadas. Essas glândulas produzem menos de 10% do volume total de saliva, porém são responsáveis por grande parte do total da secreção de proteína salivar (12, 52).

O fluido salivar é uma secreção exócrina constituída de aproximadamente 99% de água, contendo uma variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio, bicarbonato, fosfato) e proteínas, representadas por enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, glicoproteínas, traços de albumina e alguns polipéptidos e oligopeptídeos de importância para a saúde bucal. Faz parte da composição salivar a glicose e produtos nitrogenados, tais como ureia e amônia. Os componentes interagem e são responsáveis por várias funções atribuídas à saliva (53).

As principais funções da saliva presente na cavidade oral são: digestão, pela presença de amilase e lipase; proteção da mucosa bucal através do potencial lubrificante, ocasionado por seu conteúdo glicoproteico; ação mecânica de limpeza e remoção de agregados bacterianos adsorvidos nas proteínas salivares; gustação, não só dissolve e conduz substâncias a serem saboreadas até os botões gustativos, como também participa do processo de desenvolvimento e maturação deles, pela ação da

gustina; capacidade tampão, que pode agir de dois modos, primeiro desequilibrando o pH necessário para o crescimento máximo de bactérias, segundo promovendo o tamponamento dos ácidos produzidos pela placa bacteriana, através de bicarbonato e fosfato; exerce influência ecológica pelo seu amplo espectro de proteínas antibacterianas, tais como lisozima, lactoferrina, peroxidase, imunoglobulinas (IgA), proteínas ricas em prolinas e outras; possui um conteúdo iônico e proteico, que contribui para o processo de remineralização e impede a precipitação precoce de cálcio e fosfato, respectivamente (54).

O processo secretório salivar é bem conhecido e está relacionado ao estímulo dos sistemas nervosos simpático e parassimpático. Ambos promovem a secreção salivar, porém com características diferentes. O estímulo simpático leva a produção/secreção de uma saliva viscosa, rica em proteínas, enquanto o estímulo parassimpático leva a produção/secreção de uma saliva aquosa, rica em água e eletrólito (55).

A xerostomia é um dos principais sintomas relatados por pacientes diabéticos, sendo um parâmetro subjetivo relatado pelo indivíduo, que incluem sensação de boca seca, dificuldade de falar, mastigar e deglutir. A redução do fluxo salivar é uma medida objetiva denominada de hipossalivação. Outras alterações na cavidade bucal frequentes nos diabéticos são: síndrome de ardência bucal, distúrbios de gustação, ulcerações na mucosa bucal, perda precoce de dentes, dificuldade de cicatrização e hálito cetônico (56). Muitos estudos apontam outras complicações orais associadas a diabetes, aumento da incidência de cárie, infecções fúngicas, líquen plano, língua geográfica e fissuras na língua, essas alterações bucais encontradas na DM têm sua incidência ou progressão favorecida pelo descontrole glicêmico (57).

Na literatura há relatos de alterações nas glândulas salivares de animais diabéticos, que podem ser responsáveis por mudanças na composição da saliva, como o aumento da atividade da peroxidase, amilase e diminuição do fluxo salivar e do ácido sálico livre em ratos induzidos por STZ. Essa diminuição observada poderia estar relacionada com a xerostomia reportada pelos pacientes diabéticos (58).

Alguns estudos buscam explicar quais mecanismos estão associados com a redução da secreção salivar causando a xerostomia definida como a sensação de boca seca. Uma das hipóteses seria o aumento da expressão do co - transportador SGLT1 na glândula parótida e submandibular. No estudo de Robson foi observado que o aumento da expressão de SGLT1 nas glândulas salivares aumentou a

reabsorção de água na saliva primária o que pode explicar a diminuição da secreção salivar induzida pelo diabetes, isto porque esse co-transportador não transporta somente glicose, mas atua como um canal de água (59).

Outro impacto nas glândulas salivares de indivíduos diabéticos são alterações no metabolismo de carboidratos. Após 30 dias da indução por STZ foi demonstrado um aumento na atividade da enzima hexoquinase tanto das frações ligadas quanto da solúvel na glândula parótida. Já para a glândula submandibular em ambas as frações foi observado diminuição. Essa diferença pode ser explicada já que as glândulas possuem metabolismo com características diferentes, no caso da submandibular o metabolismo é predominantemente anaeróbico e da parótida predominantemente aeróbico (11). Nas glândulas salivares o metabolismo do glicogênio está alterado e concentração do mesmo tanto em ambas as glândulas está aumentado, indicando maior acúmulo desse polissacarídeo comparado com os animais controles, em função disso ocorre aumento da síntese de glicogênio sintase e redução da atividade do glicogênio fosforilase (60).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar os efeitos da utilização do chá de camomila na atividade do sistema antioxidante nas glândulas salivares submandibular e parótida de ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina, bem como avaliar o efeito sistêmico do chá de camomila na glicemia, níveis plasmáticos de insulina e via de sinalização do transporte de glicose.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação do uso do chá de camomila nos seguintes parâmetros metabólicos:

- Glicemia dos animais;
- Peso;
- Níveis de insulina no sangue;

Avaliação do uso do chá de camomila nos seguintes parâmetros:

- Parâmetros antioxidantes da via enzimática: atividade de: SOD, CAT e GPx.
- Via não enzimática pelo TAS (total antioxidante);
- Quantificação do MDA;

E estudar as possíveis alterações decorrentes do DM e os efeitos do uso do chá de camomila no fígado por meio de análise de Western Blot.

- Detectar AKT e AMPK.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os tópicos foram divididos para melhor compreensão das etapas do trabalho bem como sua metodologia.

4.1 ANIMAIS

A pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios éticos de cuidados com animais de laboratório. O estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FOU SP Protocolo 015/2016 (Anexo A).

Foram utilizados ratos Wistar, mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOU SP, com peso corporal em torno de 200 a 260g. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento, ciclo constante de 12hs claro/12hs escuro e temperatura ambiente controlada. Este sistema de manutenção de animais reduz o manuseio e como consequência o estresse desenvolvido pelos ratos reduzindo fatores que poderiam interferir nas condições experimentais.

Os animais foram divididos em 4 grupos ($n = 38$) sendo: diabéticos sem tratamento (DM) $n=10$, controles sem tratamento (C) $n=10$, diabéticos tratados com chá de camomila (DMC) e controles tratados com chá de camomila (CC).

No 7º dia experimental, os ratos dos grupos CC e DMC começaram a tomar o chá de camomila. Todos os dias pela manhã os animais eram pesados, e o seu consumo de chá do dia anterior mensurados para o devido preparo do chá em uma concentração de 200 mg/Kg.

4.2 INDUÇÃO DA DIABETES

Após um período de aproximadamente 16 horas em jejum foi realizada a injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5, para a indução do diabetes nos ratos do grupo experimental (DM) e (DMC). Os animais do grupo (C) e (CC), receberam a injeção somente do tampão. A glicemia foi determinada 72 horas após a indução e no dia do sacrifício.

A estreptozotocina (STZ), um antibiótico produzido por *Streptomyces achromogenes*, é frequentemente usado para induzir diabetes mellitus em modelos experimentais através dos seus efeitos tóxicos nas células β do pâncreas. A ação citotóxica da STZ está associada à geração de ERO causando o dano oxidativo. Seu efeito biológico reside na susceptibilidade das ilhotas do pâncreas à droga que entra no citoplasma através do transportador de glicose GLUT 2. As células β do pâncreas são particularmente sensíveis ao dano oxidativo por ERO que é atribuído aos baixos níveis de atividade das enzimas antioxidantes nessas células, enquanto o fígado e os rins, que também expressam GLUT 2, são mais resistentes (61, 62).

4.3 ADMINISTRAÇÃO DO CHÁ

Todo dia pela manhã os animais foram pesados e consumo do dia anterior foi medido, sempre no mesmo horário entre 7 e 8 horas. Para preparo do chá de acordo com o peso e consumo de cada animal. O chá foi administrado ao grupo diabético tratado (DMC) e controle tratado (CC), em substituição a água, por 21 dias consecutivos. Nosso protocolo de extração do chá de camomila foi baseado no trabalho de Nija et al. (63). Consta de 3 etapas: inicialmente fervemos a água, acrescentamos a planta e deixamos por mais 10 minutos, filtramos o chá e após esfriar administramos aos animais.

4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

A eutanásia dos animais foi realizada 21 dias após a injeção do tampão, da estreptozotocina e da administração do chá de camomila nos grupos C, DM, CC e DMC respectivamente (Figura 4.1). O sacrifício foi realizado por dose letal de anestésico Ketamina e Xilazina (60 e 20 mg/Kg - Vetbrands, Brasil). Os animais de todos os grupos foram pesados no início e no dia do sacrifício, além disso os do grupo CC e DMC foram pesados diariamente para calcular o volume e de acordo com o peso preparar o chá. As amostras de glândulas salivares submandibular, parótida e as amostras de fígado foram limpas de tecidos aderentes, prensadas entre placas de alumínio previamente resfriada e imediatamente foram imersas no nitrogênio líquido, posteriormente armazenadas no freezer -80°C até o momento do uso. Também foi coletado sangue em tubo de plástico por punção cardíaca.

Figura 4.1 – Desenho experimental. No 1º, o DM foi induzido nos animais do grupo DM e DMC. Setenta e duas horas após a indução aferimos a glicemia em jejum com glicômetro. No 7º dia, os animais do grupo CC e DMC começaram o tratamento com o chá de camomila substituindo a água. No 30º, a glicemia em jejum foi aferida com glicômetro, e foi realizada a coleta de sangue e demais tecidos de todos os animais.

Fonte: O autor

4.5 ANÁLISES

Foram realizadas as seguintes determinações:

- ✓ Glicemia;
- ✓ Determinação de insulina no soro;
- ✓ Total Antioxidante;
- ✓ Superóxido dismutase (SOD);
- ✓ Glutathione peroxidase (GPx);
- ✓ Catalase (CAT) e
- ✓ Determinação da concentração das proteínas AKT e AMPK.

4.5.1 Análises em amostras de sangue

A análise realizada em sangue foi utilizada para determinação da glicemia.

4.5.1.1 Determinação da glicemia

A determinação da glicemia foi realizada nos animais de todos os grupos através da utilização de um glicosímetro (Roche -Accu-Chek advantage). 72 horas após a indução da estreptozotocina ou administração do tampão, com os animais em jejum de 12 horas através da coleta de sangue caudal. Esta determinação foi realizada para a confirmação do estado diabético nos grupos experimentais (DM e DMC). Foram

considerados diabéticos, os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg de glicose/dl de sangue. Para os animais do grupo (C e CC), foi realizada no mesmo período para efeito de comparação, considerada a glicemia inicial.

No dia do sacrifício, com os animais em jejum de 12 horas foi aferido novamente denominada de glicemia final. Esta determinação foi realizada para análise comparativa com a glicemia inicial.

4.5.2 Análises em amostras de soro

A análise realizada em soro foi utilizada para determinação da concentração de insulina.

4.5.2.1 Determinação da concentração de insulina

O sangue coletado em tubos de plástico, foram imediatamente centrifugados a 1.540 x g por 10 minutos a 4°C para obtenção do soro. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso. A determinação da concentração de insulina foi feita pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) para ratos/camundongo – Cat #EZRMI-13 K (Merck Mollipore ®).

4.5.3 Análises em amostras de glândula salivar

As análises realizadas em amostras de glândulas salivares (submandibular e parótida) foram realizadas para determinação do perfil antioxidante e avaliação dos valores da peroxidação lipídica.

4.5.3.1 Preparo das amostras de glândula salivar

Uma alíquota de tecido das glândulas salivares parótida e submandibular foram homogeneizadas com auxílio de um Polytron em tampão PBS (NaCl , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4). Posteriormente foram centrifugadas a $800 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Em seguida o sobrenadante foi sonificado por três vezes com ciclo de 10 segundos cada vez. Novamente foram centrifugadas a $20\,000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi usado para as análises posteriores e uma alíquota foi separada para realização do teste de proteína determinado por Lowry, e diluída 1:100. Esse homogenato foi utilizado para análise do TAS, CAT, GPx e SOD.

4.5.3.2 Análise do total antioxidante (TAS)

O status antioxidante foi determinado através do Kit TAS (Randox Laboratories UK). Neste método o reagente ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) foi incubado com a peroxidase (metamioglobina) e com o peróxido de hidrogênio para produzir o radical ABTS. Este radical possui uma coloração estável verde-azulada e os antioxidantes presentes no homogenado glandular causam a supressão à formação desta coloração, proporcionalmente à concentração de antioxidantes na amostra. A variação da absorbância foi verificada em espectrofotômetro (ELISA) a 600 nm e os dados foram expressos em nmol/ mg de proteína.

4.5.3.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi determinada utilizando o Kit RANSOD (Randox Laboratories UK). Esta atividade foi medida através do grau de inibição da geração de radicais superóxidos na reação entre a xantina e a xantina oxidase com o reagente INT [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride]. Uma unidade da enzima SOD é aquela capaz de causar 50% de inibição na taxa de redução do INT. Utilizamos uma curva padrão e a variação da absorbância foi observada em espectrofotômetro (ELISA) a 505 nm e os dados foram expressos em U de SOD/ mg de proteína.

4.5.3.4 Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada através do Kit Ransel (Randox Laboratories UK). A glutathione peroxidase é responsável por catalisar a reação de oxidação da glutathione (GSH) pelo peróxido de cumeno. Na presença da glutathione redutase (GR) e NADPH a glutathione oxidada é convertida na sua forma reduzida com a simultânea oxidação do NADPH em NADP⁺. A variação da absorbância foi observada em espectrofotômetro (ELISA) a 340 nm e os dados foram expressos em U de GPx/ mg de proteína.

4.5.3.5 Determinação da atividade da catalase (CAT)

As glândulas foram homogeneizadas a 10% em tampão fosfato 50Mm Ph 7,4, centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado no ensaio de acordo com o método de Aebi o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H₂O₂, determinada espectrofotometricamente a 240 nm durante 5 minutos. Os dados foram expressos em U de CAT/ mg de proteína (64).

4.5.3.6 Quantificação do MDA

Uma alíquota de tecido das glândulas salivares parótida e submandibular foram homogeneizadas com auxílio de um Polytron em tampão ácido perclórico 0,4 M, em seguida ficaram 30 minutos no gelo. Posteriormente foram centrifugadas a 27 000 x g por 10 minutos a 4°C. Em seguida separar uma fração do sobrenadante e neutralizar com carbonato de potássio (K_2CO_3), o restante do sobrenadante separar para a dosagem de proteína determinado pelo método de Lowry, e diluída 1:20. Colocar a fração neutralizada no gelo por 10 minutos, em seguida devem ficar 1 hora no freezer -80. Novamente foram centrifugadas a 27 000 x g por 10 minutos.

O sobrenadante foi usado para as análises posteriores para a quantificação do Malondialdeído (MDA) foi realizada em HPLC, com uma coluna C18 (15 cm x 4,6 mm x 3µm). A Fase Móvel foi KH_2PO_4 (50mM), Metanol (65:35), com fluxo 0,6 ml/min. Uma curva padrão de MDA foi preparada e utilizada no cálculo das amostras. Os dados foram expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

4.5.3.7 Determinação de proteína total

A concentração de proteína total das amostras de sobrenadante dos homogenizados glandulares foi determinada segundo o método de Lowry (1951) (ref), utilizando-se albumina bovina (BSA) como padrão. As leituras foram realizadas a 660 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg/ml (65).

4.5.4 Análises em amostras de fígado

A análise realizada em fígado foram para determinar a expressão de duas proteínas importantes no transporte da glicose por meio do Western Blot.

4.5.4.1 Preparo das amostras de fígado para Western Blot

Para a extração de proteínas totais de fígado e músculo gastrocnêmio, uma alíquota de 100 mg de tecido foi homogeneizada com auxílio de um Polytron em 0,8 ml de tampão de extração (EDTA 10 mM; Trizma base 100 mM) contendo inibidores de fosfatases (pirofosfato de sódio 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM) e inibidores de proteases (aprotinina 1,6 µg/mL; phenylmethylsulfonyl fluoride – PMSF 2 mM). Após a homogeneização, 80 µl de Triton X-100 10% foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas no gelo por 30 minutos e centrifugadas a 20 000 x g 4 °C por 40 minutos. A seguir, a concentração proteica do sobrenadante foi determinada.

4.5.4.2 Determinação de proteína total

A concentração de proteínas totais na amostra foi determinada pelo método de Bradford utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Para determinação da concentração protéica, as amostras foram diluídas em água Milli-Q e 10 µl de cada amostra ou curva padrão de BSA (0,05 a 1,0 mg/ml) foram distribuídos em placa de 96 poços. A seguir, 190 µl de solução de Bradford (BioGen) foram adicionados aos poços e a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA utilizando o comprimento de onda de 595 nm. A concentração proteica das amostras foi determinada a partir da curva padrão de BSA (66).

4.5.4.3 Preparo para o SDS-PAGE

Alíquotas dos extratos proteicos de fígado foram adicionadas ao tampão de Laemmli (5 x concentrado, SDS 10%, glicerol 50%, fosfato de sódio 50 mM e azul de bromofenol 0,01%) na proporção 5:1 e fervidas a 100 °C por 5 minutos.

As amostras foram submetidas a SDS-PAGE. Géis de separação/resolução de 10% de acrilamida, com géis de empacotamento de 10% de acrilamida, com espessura de 1,5 mm, foram montados num sistema vertical de eletroforese (BIO-RAD) e imersos em tampão de corrida gelado (Trizma base 50 mM, glicina 380 mM, EDTA 1,8 mM e SDS 0,1%). Alíquotas contendo 50 µg de proteína foram aplicadas nos géis e a corrida eletroforética foi realizada a 200 V, por aproximadamente 1,5 hora. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular “Precision Plus Protein Standards Dual Color” (BIO-RAD).

4.5.5 Western Blot

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose de 0,4 µm (BIO-RAD), utilizando “Trans-Blot Turbo” (BIO-RAD) e tampão de transferência (Trizma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,02%)., a 15 V por 1 hora. A qualidade da transferência foi verificada corando-se a membrana com Ponceau 0,5%.

4.5.5.1 “Imunoblotting”

A membrana de nitrocelulose pós-transferência seguiu para o procedimento de imunodeteção.

Incubação em solução de bloqueio BSA 5% diluída em solução basal (Trizma base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,25%) durante 2 horas, sob agitação constante em temperatura ambiente.

Incubação com o anticorpo primário (*Cell Signaling, MA, EUA*) diluído em BSA 1% em solução basal, *overnight*, sob agitação constante em temperatura ambiente. Os pesos moleculares das proteínas e as diluições dos anticorpos estão listados na tabela abaixo (Tabela 4.1).

Incubação com o anticorpo secundário (*Cell Signaling, MA, EUA*) diluído 1:5.000 em BSA 1% em solução basal, durante 1 hora sob agitação constante em temperatura ambiente.

Após cada etapa, as membranas foram lavadas 3 vezes, durante 10 minutos, com solução basal.

Tabela 4.1 – Anticorpos utilizados no Western blotting, seus pesos moleculares e diluições

Anticorpo	Peso molecular	Diluição
p- AKT (Cell Signaling)	60 KDa	1:1000
AKT (Cell Signaling)	60 KDa	1:10.000
p-AMPKα (Cell Signaling)	62 KDa	1:4.000
AMPKα (Cell Signaling)	62 KDa	1:10.000
β-tubulina (Cell Signaling)	55 KDa	1:10.000

Fonte: O autor

4.5.5.2 Revelação das membranas

A solução de revelação foi preparada pela mistura dos reagentes do kit Pierce ELC Western blotting substrate # 32106 na proporção de 1:1 (1 parte da solução peroxide: A e 1 parte da solução Luminol Enhancer B). Essa solução foi colocada sob a membrana o que resulta em uma reação de quimioluminescência. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria pelo *software* (Scion).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos diferentes grupos foi realizada com o teste de análise de variância (ANOVA), seguido do pós teste de Tuckey. O software utilizado foi o GraphPad Prisma 5. O nível de significância de 5% foi considerado para todas as comparações e os dados foram expressos como média e $\pm$ desvio padrão (DP).

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em tópicos para melhor compreensão dos diferentes objetivos do presente trabalho.

5.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

A Figura 5.1 mostra uma comparação entre a glicemia inicial e final realizada com glicosímetro. A glicemia inicial do grupo controle sem tratamento (C) apresentou uma média de 103.7 ± 23.25 mg de glicose/dL de sangue, o grupo controle tratado com chá (CC) exibiu uma média de 95.75 ± 18.02 mg de glicose/dL de sangue, aumentando no grupo diabético sem tratamento (DM) 388.5 ± 119.6 mg de glicose/dL de sangue, e no grupo diabético tratado com chá (DMC) 390.4 ± 50.44 mg de glicose/dL de sangue,. No entanto o tratamento com chá de camomila provocou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) na glicemia final dos animais do grupo (DMC) que atingiu uma média de 175.2 ± 123.9 mg de glicose/dL de sangue, a glicemia final desse grupo ficou 43% menor quando comparado com o grupo (DM) com média de 496.5 ± 81.26 mg de glicose/dL de sangue. Esta redução foi maior e estatisticamente significativa ($p < 0.0001$) quando comparamos os níveis de glicemia dentro do grupo (DMC), que apresentou uma redução de 55% da glicemia final em relação a inicial. Comparando os valores da glicemia inicial e final do grupo (CC) não encontramos diferença estatisticamente significativa observamos que o chá não interfere nos níveis glicêmicos dos ratos controles.

Figura 5.1- Glicemia em jejum (mg de glicose/dL de sangue), aferida com glicosímetro 72 horas após a indução do diabetes e no 30º dia. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). (&p< 0.0001 C final vs DM final, * p< 0.0001 vs C, + p< 0.0001 DMC inicial vs DMC final, # p< 0.0001 DM final vs DMC final). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way pós teste Tuckey)

Fonte: O autor

Uma vez que o chá de camomila está relacionado com a redução dos valores de glicemia investigamos as possíveis alterações nos níveis de insulina destes animais com o teste de ELISA (kit Millipore Rat/Mouse Insulin Cat #EZRMI-13K). Nossos resultados indicaram que o tratamento com chá não alterou os níveis de insulina entre os grupos estudados. A menor quantidade de insulina detectada nesse kit de insulina é de 0.1 ng/mL (17.5 pM). No grupo diabético sem tratamento (DM) e diabético tratado com chá (DMC) não foram detectáveis níveis de insulina na sensibilidade desse kit (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Níveis de insulina (ng/mL) presente no soro. Não houve diferença estatisticamente significativa entre nenhum dos grupos. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). Além disso, os níveis de insulina não foram detectados no grupo DM e DMC. C n=5, DM n= 8, DMC n= 8 e CC n=5. Os valores são expressos em média $\pm$ DP

Grupos	C	DM	CC	DMC
Insulina (ng/mL)	0.5338 $\pm$ 0.2173	-	0.3100 $\pm$ 0.1837	-

Fonte: O autor

A Figura 5.2 apresenta uma relação entre o peso inicial e o peso final dos quatro grupos experimentais. Quanto ao peso corporal dos animais no início do período experimental (peso inicial), observamos que, os quatro grupos apresentavam pesos iniciais acima de 200g sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo que os animais do grupo controle sem tratamento (C) exibiam uma média de 251.9 $\pm$ 38.11 g, o grupo diabético sem tratamento (DM) uma média de 212.4 $\pm$ 12.92 g, grupo controle tratado com chá (CC) 236.7 $\pm$ 30.31 g e o grupo diabético tratado com chá (DMC) 228.3 $\pm$ 15.89 g. O peso final atingido no dia da eutanásia 30º dia pelo grupo DM apresentou uma redução de 13% em relação ao peso inicial apresentando uma média 184.3 $\pm$ 16.01 g, além disso, o peso desse grupo exibiu uma diminuição estatisticamente significativa em relação ao peso dos grupos C e CC com médias de peso final de 315.0 $\pm$ 28.98 g e 337.8 $\pm$ 34.82 g respectivamente. O tratamento com chá de camomila não preveniu a perda de peso corporal dos animais diabéticos tratados (DMC) com média final de 123.9 $\pm$ 21.36 g. E os animais de ambos os grupos controles C e CC apresentaram aumento estatisticamente significativo do peso final em relação ao peso inicial de 25% e 42% respectivamente.

Figura 5.2 – Massa corpórea (g). Os animais foram pesados no início do tratamento e no 30º dia (eutanásia). Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). (* $p < 0.0001$ C inicial vs C final; * $p < 0.0001$ CC inicial vs CC final; * $p < 0.0001$ DM inicial vs DM final. (# $p < 0.0001$ C final vs DM final, + $p < 0.0001$ CC vs DMC). Grupo C $n = 8$, grupo DM $n = 10$, grupo CC $n = 8$ e grupo DMC $n = 10$. Os valores estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão. (ANOVA, one way *pos teste* Tuckey)

Fonte: O autor

5.2 CONSUMO RAÇÃO E ÁGUA/CHÁ DE CAMOMILA

A Figura 5.3 A representa a média dos valores diários da ingestão alimentar dos grupos estudados. Observamos que os grupo diabético sem tratamento (DM) e o grupo diabético tratado com chá (DMC) apresentaram média 180.3 ± 15.14 g e 219.9 ± 77.03 g respectivamente, exibindo maior consumo de ração (polifagia), quando comparados aos grupos controle sem tratamento (C) com média 86.20 ± 12.97 g e ao controle tratado com chá (CC) com média 51.83 ± 29.27 g. O tratamento com o chá de camomila não promoveu melhora da diminuição da ingesta alimentar, pois não apresentou diferença estatisticamente significativa comparando ao grupo diabético sem tratamento. A Figura 5.3 B representa a média dos valores da ingestão de líquidos. Para o grupo controle sem tratamento (C) e para o grupo diabético sem tratamento (DM) a ingestão foi de água e as médias foram 191 ± 46.61 mL e 1940 ± 30.4 mL respectivamente. Já para grupo controle tratado com chá (CC) e para o grupo diabético tratado com chá (DMC) foi quantificado o consumo do chá de

camomila, e as médias dos grupos tratados foram 122.6 ± 78.30 mL e 877 ± 320.1 mL respectivamente. Os animais dos grupos DM e DMC apresentaram maior consumo de água e chá respectivamente (polidipsia) comparado aos grupos controles. No entanto, o tratamento com chá de camomila promoveu diminuição da ingesta de líquidos no grupo DMC comparado ao DM.

Figura 5.3 – A ingestão de líquidos (Figura A) e (Figura B) consumo de ração nos grupos Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- Ingestão de ração (g/Kg/24h) (* $p < 0.0001$ C vs DM, # $p < 0.0001$ CC final vs DMC final). C n=10, DM n= 10, CC n=6 e DMC n= 7. B- A ingestão de líquidos (mL/Kg/24h), água para os grupos C e DM e chá de camomila para os grupos CC e DMC. (* $p < 0.0001$ C vs DM, + $p < 0.0001$ DM vs DMC, # $p < 0.0001$ CC vs DMC). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 7. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way *pós teste Tuckey*)

Fonte: O autor

5.3 PARÂMETROS ANTIOXIDANTES NA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR

Nas glândulas submandibulares com relação à atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), não observamos diferença estatisticamente significativa nos grupos estudados Figura 5.4 A. A respeito da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx), os animais do grupo diabético tratado com chá (DMC) com média 0.1584 ± 0.1354 U de GPx/mg de proteína, apresentaram um aumento de 528% nos valores da atividade dessa enzima, em relação ao controle sem tratamento (C) com média de 0.02521 ± 0.02689 U de GPx/mg de proteína, comparando com o grupo controle tratado com média de 0.04092 ± 0.01596 U de GPx/mg de proteína, esse aumento foi de 287% e com relação ao grupo diabético sem tratamento (DM) com média de $0,03868 \pm 0.02813$ U de GPx/mg de proteína, o aumento foi de 309% nos valores da atividade dessa enzima (Figura 5.4 B). A administração do chá de camomila ocasionou um aumento de 530% nos valores da atividade de outra enzima a catalase (CAT) no grupo diabético tratado (DMC) apresentando uma média de 7.831 ± 4.306 U de CAT /mg de proteína, com relação ao controle sem tratamento (C) com média de 1.243 ± 1.399 U de CAT /mg de proteína, comparando com o grupo controle tratado com chá de camomila (CC) com média 4.393 ± 1.887 U de CAT /mg de proteína, o aumento foi de 78% e com relação ao grupo diabético sem tratamento (DM) com média 3.626 ± 0.9110 U de CAT /mg de proteína, esse aumento foi de 115% nos valores da atividade dessa enzima (Figura 5.4 C).

Figura 5.4- A atividade enzimática da SOD, GPx, GR e CAT na glândula submandibular. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- A atividade da enzima superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína) C n=10, DM n= 10, grupo, CC n=8 e DMC n= 10. B- Atividade da glutathiona peroxidase (U de GPx/mg de proteína), a (* $p < 0.01$ vs C, CC e DM). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 10. C- Atividade da enzima CAT (U de CAT/mg de proteína) (* $p < 0.0001$ vs C, * $p < 0.001$ vs DM, * $p < 0.05$ vs CC). C n=10, DM n= 9, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way *pos teste* Tuckey)

Fonte: O autor

Na glândula submandibular administração do chá de camomila ocasionou um aumento nos valores do total antioxidante (TAS) no grupo diabético tratado (DMC) com média de 0.2903 ± 0.06706 nmol/mg de proteína, esse aumento foi de 82% em relação ao grupo controle sem tratamento (C) com média 0.1159 ± 0.02479 nmol/mg de proteína, comparando com o grupo controle tratado com chá (CC) com média de 0.2001 ± 0.08263 nmol/mg de proteína, esse aumento foi de 45% e com relação ao

grupo diabético sem tratamento (DM) com média de 0.2023 ± 0.03898 nmol/mg de proteína, esse aumento foi de 43% nos valores da atividade do TAS (Figura 5.5 A). Os valores de malondialdeído (MDA) na glândula submandibular não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 5.5 B).

Figura 5.5 - A- Valores de total antioxidante (nmol/mg de proteína), na glândula submandibular. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). (&p< 0.05 C vs DM, #p< 0.0001 C vs DMC, *p< 0.01 DMC vs DM, +p< 0.01 CC vs DMC). C n=9, DM n= 7, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. B- Valores de MDA uM/mg de proteína não encontramos diferença estatisticamente significativa. C n=8, grupo DM n= 9, CC n=8 e DMC n= 10. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*)

Fonte: O autor

5.4 PARÂMETROS ANTIOXIDANTES NA GLÂNDULA PARÓTIDA

Nas glândulas parótida com relação à atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) não observamos diferença estatisticamente significativa nos grupos estudo (Figura 5.6 A). A respeito da atividade da enzima glutational peroxidase (GPx), os animais do grupo diabético tratado com chá (DMC) com média 0.1839 ± 0.1549 U de GPx/mg de proteína apresentaram um aumento de 386% nos valores da atividade dessa enzima, em relação ao controle sem tratamento (C) com média de 0.03777 ± 0.03854 U de GPx/mg de proteína comparando com o grupo controle tratado (CC) com média de 0.0515 ± 0.05386 U de GPx/mg de proteína, esse aumento foi de 257% e com relação ao grupo diabético sem tratamento (DM) com média de 0.0343 ± 0.01846 U de GPx/mg de proteína o aumento foi de 436% nos valores da atividade dessa enzima (Figura 5.6 B). A administração do chá de camomila ocasionou um aumento de 415% nos valores da atividade de outra enzima a catalase (CAT) no grupo diabético tratado (DMC) apresentando uma média de 7.306 ± 4.554 U de CAT/mg de proteína com relação ao controle sem tratamento (C) com média de 1.417 ± 1.676 U de CAT/mg de proteína. (Figura 5.6 C).

Figura 5.6- A atividade enzimática da SOD, GPx, GR e CAT na glândula parótida. Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- A atividade da enzima superóxido dismutase (U de SOD/mg de proteína) C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 10. B- Atividade da glutathione peroxidase (U de GPx/mg de proteína) (* p< 0.001 vs C, * p< 0.001 vs DM, * p< 0.05 vs CC). C n=10, DM n= 10, CC n=8 e DMC n= 7. C- Atividade da enzima CAT (U de CAT/mg de proteína) (* p< 0.001 DMC vs C). C n=9, DM n= 8, CC n=6 e DMC n= 9. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*)

Fonte: O autor

Na glândula parótida o valor do total antioxidante (TAS) (Figura 5.7 A) não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Os

valores de malondialdeído (MDA) na glândula parótida (Figura 5.7 B) apresentou-se maior no grupo diabético sem tratamento (DM) com média de 1644 ± 463.9 uM/mg de proteína quando comparado ao grupo diabético tratado (DMC) com média de 676.3 ± 254.0 uM/mg de proteína, observamos que o grupo que DMC tratado com chá de camomila provou uma redução dos valores de MDA.

Figura 5.7- Controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). A- Valores de total antioxidante (nmol/mg de proteína), na glândula parótida, não apresentam diferença estatisticamente significativa. C n=9, DM n= 10, CC n=9 e DMC n= 8. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. B- Valores de MDA (uM/mg de proteína). (* $p < 0.004$ vs DMC). C n=7, DM n= 7, CC n=9 e DMC) n= 7. Os valores são expressos em média $\pm$ DP. (ANOVA, one way *pos teste Tuckey*)

Fonte: O autor

5.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA AMPK/AKT NO FÍGADO

Análise da expressão da proteína AMPK (fosforilada) e (total) no fígado por meio de Western Blot. Da esquerda para a direita os grupos são: controle tratado com chá (CC), diabético tratado com chá (DMC), controle sem tratamento (C) e diabético

sem tratamento (DM). A análise quantitativa sugere uma diminuição da p-AMPK no grupo diabético tratado com chá de camomila (Figura 5.8).

Figura 5.8- Análise das proteínas p- AMPK e AMPK por meio de Western Blot. Em cima expressão da proteína p- AMPK (63 KDa), AMPK total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado. Da esquerda para a direita: controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). Em baixo análise quantitativa da proteína p- AMPK (63 KDa), AMPK total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado, cada banda representa um animal diferente. CC n=6, DMC n= 6, C n=6 e DM n= 6. (* $p < 0.005$ p-AMPK DMC vs C). Os valores são expressos em média $\pm$ DP

Fonte: O autor

Análise da expressão da proteína AKT (fosforilada) e (total) no fígado por meio de Western Blot. Da esquerda para a direita os grupos são: controle tratado com chá (CC), diabético tratado com chá (DMC), controle sem tratamento (C) e diabético sem tratamento (DM) (Figura 5.9).

Figura 5.9- Análise das proteínas p- AKT e AKT por meio de Western Blot. Em cima expressão da proteína p- AKT (63 KDa), AKT total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado. Da esquerda para a direita: controle sem tratamento (C); Diabético sem tratamento (DM); Controle tratado com chá (CC) e Diabético tratado com chá (DMC). Em baixo análise quantitativa da proteína p- AKT (63 KDa), AKT total (63 KDa), β -tubulina (55 KDa) no fígado, cada banda representa um animal diferente. CC n=6, DMC n= 6, C n=6 e DM n= 6. Os valores são expressos em média $\pm$ DP

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais tornaram-se alvo de pesquisas científicas para comprovação dos seus efeitos na melhora do quadro do paciente diabético e melhor entendimento de seus mecanismos de ação. Os atuais tratamentos para o diabetes incluem a insulinoterapia e tratamento com hipoglicemiantes orais, que agem na redução da glicemia a partir de diferentes mecanismos. Tais mecanismos incluem a redução da produção de glicose hepática, aumento na secreção de insulina pelas células beta do pâncreas, melhora da sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos e inibição da absorção da glicose intestinal (67). No entanto, tais drogas podem apresentar efeitos indesejáveis aos pacientes, além de diminuição da resposta ao longo do tratamento. É nesse contexto que se encontra o interesse pela pesquisa com plantas medicinais, dentre elas a *Chamomilla recutita* (L). Sabe-se que essa planta possui princípios ativos que podem agir na diminuição da concentração de glicose sanguínea e consequente melhora no quadro diabético (68). Desse modo, focando na busca por novas opções terapêuticas que possam melhorar a qualidade de vida do indivíduo diabético, este estudo dedicou-se à investigação da ação hipoglicemiante e antioxidante da *Chamomilla recutita* (L) (chá de camomila) nas glândulas salivares de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ).

A hiperglicemia decorrente do DM é consequência dos defeitos ou da falta da ação da insulina (4, 22). A indução do diabetes experimental em modelos animais é realizada através do uso de substâncias como a utilizada nesse estudo a (STZ) que destrói seletivamente as células β do pâncreas, produtoras de insulina, com efeito citotóxico, essa droga é um análogo da glicose e seu mecanismo de ação é através da captação pelas células β do pâncreas (69). O modelo experimental de indução de diabetes pela STZ utilizado neste trabalho comprovou que a mesma agiu na destruição das células β do pâncreas dos animais, ao observar o aumento significativo da glicemia de jejum dos ratos induzidos acima de 380mg de glicose /dL sangue em relação à glicemia dos animais controles. A ação da *Chamomilla recutita* (L) como hipoglicemiante tem sido comprovada em diversos estudos (40, 41, 43-46) sendo administrada em diversas concentrações e diferentes tempos de tratamento. Esses trabalhos mostraram que a *Chamomilla recutita* (L) reduziu os níveis de glicose sanguínea em todas as concentrações e tempos estudados. Os valores de glicemia

final apresentados no nosso trabalho foram determinados no dia do sacrifício do animal. Os animais pertencentes ao grupo diabético sem tratamento apresentavam valores de glicemia muito elevados comparados aos grupos controles e ao grupo diabético tratado com chá de camomila apresentando uma redução da glicemia, após 21 dias de tratamento com o chá de camomila. Nosso resultado corrobora com os trabalhos presentes na literatura e confirma o efeito *Chamomilla recutita* (L) na redução dos níveis glicêmicos (40, 41, 43-46). Como visto, o tratamento com chá de camomila na dose de 200mg/Kg durante 21 dias, revelou que o mesmo apresenta atividade hipoglicemiante em animais diabéticos, visto a diminuição da glicemia dos mesmos. Estudos recentes têm mostrado que os flavonoides presentes nas plantas entre elas *Chamomilla recutita* (L) podem agir na diminuição da glicose sanguínea em modelos de diabetes experimentais. Tais estudos utilizando flavonoides isolados, como quercetina, mostraram que o tratamento com os mesmos promoveu diminuição da glicemia de jejum de animais diabéticos induzidos por STZ. Pode-se sugerir, portanto, que os flavonoides presentes chá de camomila participem da redução da glicemia (70). Outro estudo apontou a quercetina e escutina como inibidores da α -glicosidase intestinal responsável pela degradação do amido em glicose. Ao inibir a atividade dessa enzima provocam um retardo da digestão de carboidratos consequentemente reduzindo a glicemia pós-prandial. Outros dois constituintes das flores da camomila conhecidos como ácido clorogênico e ácido fenólico podem desacelerar a absorção de carboidratos pela inibição do transporte de glicose intestinal e da mesma maneira reduzir a glicemia pós-prandial. Ambos os mecanismos estão envolvidos na ausência de prevenção da perda de peso que será discutido mais adiante. A redução da glicemia pode estar ainda relacionada com a inibição de enzimas-chaves envolvidas na gliconeogênese e na via glicolítica, além de estimular a utilização da glicose periférica, especialmente em tecido muscular e adiposo (43). Os níveis glicêmicos dos animais do grupo controle tratado com chá não apresentaram alteração, indicando que o chá não influencia na glicemia de animais normoglicêmicos, esse achado está de acordo com a literatura, e corrobora com outro estudo (40). Nossa escolha em preparar o chá de camomila e administrar em substituição à ingestão hídrica de água, e não por gavagem como a maioria dos estudos são realizados, se justifica por uma razão principal. Um trabalho apontou que a propriedade hipoglicemiante do chá de camomila, seria mais eficaz se o mesmo fosse consumido simultaneamente ao consumo de carboidrato. (71).

Os sintomas característicos do diabetes incluem aumento da ingestão hídrica (polidipsia), da ingestão alimentar (polifagia) e produção excessiva de urina (poliúria) (4, 22, 72). O aumento da ingestão alimentar que ocorre nessa síndrome pode ser atribuído a distúrbios nos processos de regulação da fome pelo centro da saciedade, localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial, que necessita de insulina para a captação de glicose, desse modo após captação desse carboidrato ocorre a inibição desse centro. No caso do diabetes, devido à falta de insulina, o centro não capta a glicose, portanto não ocorre sua inibição, estimulando assim a maior ingestão alimentar (73). No presente estudo os animais do grupo diabético apresentaram polifagia quando comparados aos grupos controles. O tratamento com o chá de camomila não promoveu melhora da diminuição da ingesta alimentar, pois não apresentou diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo diabético sem tratamento. Outro sintoma clássico a polidipsia também está presente nos animais diabéticos, isto é explicado em razão dos níveis elevados de glicose no sangue, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular com o intuito de manter o equilíbrio osmótico. Os osmorreceptores localizados no cérebro reconhecem a desidratação intracelular gerando uma resposta característica por sede intensa (74). O tratamento com chá de camomila promoveu diminuição no sintoma de polidipsia em relação aos animais diabéticos não tratados, pelo provável reequilíbrio osmótico, uma vez que houve diminuição da hiperglicemia no grupo tratado, como discutido anteriormente. A diminuição nos níveis glicêmicos do sangue, promovida pelo chá de camomila pelos prováveis mecanismos discutidos anteriormente, regulou a osmolaridade sanguínea, diminuindo, portanto, a perda de água e necessidade de maior ingestão hídrica.

O terceiro sintoma clássico do diabetes induzido por STZ é a significativa perda de peso, que se deve à perda ou degradação de proteínas estruturais e aumento da lipólise. O hormônio responsável por regular o metabolismo dos carboidratos, síntese de proteínas e formação e armazenamento de lipídeos é a insulina. Esse hormônio facilita o transporte de glicose para as células musculares e adiposas. No caso de elevadas concentrações de carboidratos, a insulina faz com que seja armazenado sob a forma de glicogênio, principalmente no fígado e nos músculos. Além disso, todo o excesso de carboidratos que não pode ser armazenado como glicogênio é convertido sob estímulo da insulina, em gordura e armazenado no tecido adiposo, além de diminuir o catabolismo proteico (17). Na ausência de insulina ocorre proteólise

muscular e lipólise, o que contribui para diminuição do peso corpóreo. O diabetes tipo 2 está frequentemente associado ao sobrepeso e obesidade, entretanto, no diabetes tipo 1, em função de uma deficiência absoluta de insulina, o paciente pode apresentar perda de peso corporal em função de um comprometimento anabólico. Os animais diabéticos estudados neste trabalho apresentaram significativa perda de peso em relação aos animais controles, enquanto os animais desse último grupo apresentaram ganho de peso no decorrer do período experimental. Nosso estudo confirmou a perda de peso corporal no modelo diabético induzido por STZ, esse achado corrobora com diversos estudos utilizando o mesmo modelo (11, 49, 75, 76). O tratamento com o chá de camomila não preveniu a perda de peso decorrente do diabetes nos animais do grupo diabético tratado, pois não houve diferenças significativas entre o peso destes e dos animais do grupo diabético não tratado, além disso o primeiro apresentou diferença entre o peso inicial e o peso final. A perda corporal ocasionada pela administração do chá de camomila pode ter sido ocasionada por dois de seus compostos ativos o esculetin e a quercetina, eles atuam inibindo a α -glicosidase intestinal, que é responsável pela degradação do amido em glicose. Ao inibir a atividade dessa enzima provocam um retardo da digestão de carboidratos consequentemente reduzindo a glicemia pós-prandial. Outros dois constituintes das flores da camomila conhecidos como ácido clorogênico e ácido fenólico podem desacelerar a absorção de carboidratos pela inibição do transporte de glicose intestinal (43). Estudos relacionados as propriedades dos flavonoides como a quercetina mostraram diminuição na concentração sérica tanto de colesterol quanto de triglicérides de animais diabéticos (77). A perda de peso corporal causada pela administração do chá de camomila seria um efeito colateral indesejado para indivíduos diagnosticados com o diabetes tipo 1, em contrapartida, poderia representar uma boa alternativa para pacientes diagnosticados com diabetes tipo 2 associado a sobrepeso ou obesidade.

A fim de investigar mais profundamente os mecanismos envolvidos na diminuição dos níveis glicêmicos foram dosados os níveis de insulina séricos. Os níveis de insulina dos grupos diabéticos não foram detectados em nossa análise, provavelmente devido aos níveis presentes estarem abaixo do limite de sensibilidade do kit, comprovando o modelo diabético representado pela ausência de insulina em função de uma destruição seletiva das células β sugerindo mais uma possível explicação para a perda de peso, já que a insulina é um hormônio anabolizante, e a

sua ausência provoca alteração no metabolismo ocorrendo depredação proteica e lipólise. A influência do tratamento com chá de camomila na redução dos níveis glicêmicos não foi em consequência de um aumento da secreção de insulina. A fim de buscar outro mecanismo que pudesse explicar essa redução glicêmica foi investigado a expressão de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica no fígado. A via PI3-K/AKT, é a principal via ativada pela insulina através de seu receptor (IR). A partir da sua ativação ocorre uma cascata de eventos, mediada pela interação proteína-proteína, que leva às ações metabólicas da insulina. A proteína PI3-K, ativada pela insulina é responsável, dentre outras funções, pela fosforilação e ativação da proteína AKT que, uma vez fosforilada, é responsável por armazenar glicose no fígado e impedir os processos degradativos da mesma (20). A avaliação da expressão das proteínas p-AKT e AKT total estudadas neste trabalho não mostram diferenças entre os grupos estudados. Mas somente essa via não explicaria a diminuição da glicemia, discutido anteriormente. Existe uma segunda via que atua independente da insulina, transportando glicose para dentro da célula. A via da AMPK que também foi investigada nesse trabalho. Nossos resultados mostram uma diminuição da expressão dessa proteína no grupo diabético tratado em relação ao grupo controle. Este resultado sugere, que o tratamento com o chá pode interferir no transporte de glicose, portanto, tendo um efeito colateral indesejado. Já que foi observado diminuição da expressão dessa proteína tal resultado aponta que essa via não foi responsável pela diminuição da glicemia. O aumento da atividade AMPK é responsável pelo aumento da expressão dos transportadores de glicose. Os transportadores de glicose (GLUT) permitem o fluxo de glicose e outros açúcares através da membrana por difusão facilitada. O chá de camomila provoca uma inibição dos transportadores de glicose (71). Alguns constituintes do chá de camomila como os flavonoides entre eles o apigenina e quercetina demonstraram inibir o GLUT 2 presentes no fígado, dessa forma, inibem a captação de glicose (78). A diminuição da expressão da AMPK poderia ser um efeito em função do chá provocar uma inibição dos transportadores de glicose.

O efeito básico da ausência da insulina ou a resistência à ação da insulina sobre o metabolismo da glicose é impedir a captação eficiente e utilização da glicose, pela maioria das células do organismo. Como resultado, a concentração glicêmica aumenta, levando a um quadro clínico denominado hiperglicemia. A hiperglicemia crônica presente no indivíduo diabético vem sendo considerada a principal

responsável pelo aumento da geração de radicais livres entre eles as EROs. Quando a produção dos radicais livres excede a capacidade de defesa do sistema antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, provocando diversos danos incluindo a glicação das enzimas que compõe nosso sistema antioxidante, consequentemente inativando-as. Nosso sistema de defesa antioxidante é formado pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) enzimas que compõem a via enzimática e por uma via não enzimática. A enzima SOD possui duas isoformas, a MnSOD e a CuZnSOD, sendo que a primeira se encontra no interior das mitocôndrias e a segunda está localizada no citoplasma celular. Em um estudo observando o efeito do diabetes na atividade desta enzima em glândulas salivares em ratos induzidos por STZ não foi encontrado alterações significativas nos ratos diabéticos quando comparados com os controles (49). Nossos resultados estão de acordo com esse trabalho, pois não encontramos diferença estatisticamente significativa para a atividade da SOD na glândula parótida e submandibular nos grupos estudados.

Nosso trabalho também analisou a atividade de outras duas enzimas importantes que compõe o sistema antioxidante enzimático, a CAT e a GPx. Ambas responsáveis por remover o peróxido de hidrogênio, apesar disso são enzimas diferentes. Isto porque, enquanto, a CAT catalisa a reação de dismutação, onde uma molécula de H_2O_2 é reduzida a H_2O e O_2 . A GPx remove H_2O_2 reduzindo a H_2O e simultaneamente ocorre a oxidação da glutathione reduzida (GSH). Em um estudo observando o efeito do diabetes na atividade desta das duas enzimas nas glândulas salivares foi encontrado um aumento na atividade da CAT em ambas as glândulas e com relação a atividade da GPx mostrou aumento na glândula parótida e diminuição na glândula submandibular (49). Outro estudo encontrou aumento na atividade da CAT e GPx na glândula submandibular em ratos induzidos por aloxana entretanto sem nenhuma alteração em glândula parótida (79). Nossos resultados corroboram com esse último estudo com relação a glândula parótida, pois também não observamos nenhuma alteração no grupo diabético sem tratamento. Porém não corrobora quanto a glândula submandibular, nossos achados não apontam nenhuma alteração na atividade de nenhuma das duas enzimas na glândula submandibular do grupo diabético sem tratamento. O tratamento com chá de camomila provocou aumento da atividade da GPx em ambas as glândulas no grupo diabético tratado em relação ao grupo diabético e aos grupos controles. Da mesma forma o chá ocasionou aumento

dos valores da atividade da CAT na glândula submandibular em relação ao grupo diabético e aos grupos controles, no entanto, na glândula parótida esse aumento foi observado no grupo DMC em relação ao grupo controle não tratado. Nossos achados corroboram com outro trabalho, mostrando aumento da atividade da CAT e GPx no soro, de ratos diabéticos induzidos por STZ, tratados com chá de camomila (47). Esses resultados podem ser explicados em função das propriedades, já discutidas hipoglicemiante do chá de camomila, demonstrado no grupo tratado. Concomitantemente a diminuição da glicemia, diminuiria a geração de EROs e consequentemente da peroxidação lipídica como será discute adiante, os valores da atividade dessa enzima aumentariam em função de uma menor utilização com relação a glândula parótida. Para a glândula submandibular o aumento dos valores da via enzimática pode seguir o mesmo raciocínio, além disso foi observado aumento do TAS que sugere aumento da atividade da via não enzimática nessa glândula que é mais suscetível a peroxidação lipídica, apesar de não se observar no presente estudo essa condição, como será discutido adiante.

O total antioxidante (TAS) inclui ambas as vias do nosso sistema antioxidante. E no caso da via não enzimática pode ser representado pela vitamina C, vitamina E e pelo chá de camomila devido as propriedades antioxidante. Nossos resultados mostram um aumento do TAS na glândula submandibular no grupo diabético tratado em relação aos demais grupos. O tratamento com chá de camomila pode ter influenciado esse aumento, nos valores da atividade das enzimas antioxidantes e da via não enzimática isso devido ao metabolismo dessa glândula torná-la menos preparada para lidar com o estresse oxidativo. No entanto, para a glândula parótida os valores do TAS não apresentaram diferença entre os grupos, poderia sugerir que nessa glândula o chá influenciou somente a via enzimática.

A formação intensificada de radicais livres que ocorre em um ambiente com altas concentrações de glicose, provocam diversos danos, reagindo com as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídeos os mais suscetíveis, ocasionando alterações peroxidativas que resultam em elevação dos produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA), considerado um importante marcador do estresse oxidativo. Nossos resultados mostram que a glândula submandibular não apresentou peroxidação lipídica. Entretanto, apesar de não ter sido observado aumento do MDA no grupo diabético não tratado, o grupo diabético tratado em função de ter ambas as vias do sistema antioxidante com valores maiores em relação aos

grupos controles e diabético sem tratamento, poderiam sugerir que o chá atuou prevenindo o estresse oxidativo. Isto porque outros estudos da literatura apontam maior suscetibilidade ao estresse oxidativo nessa glândula (76, 79). Nosso estudo pode não ter observado o aumento da peroxidação lipídica nesse glândula, pois a mesma apresenta danos em períodos mais tardios da DM (75). No entanto, para a glândula parótida o grupo diabético sem tratamento apresentou maior peroxidação lipídica este resultado corroboro com outro estudo (75). A glândula parótida sobre maior influência no estado hiperglicêmico nos períodos iniciais do diabetes. Este resultado sugere que o aumento das enzimas antioxidantes observado no grupo diabético tratado com chá estaria relacionado a maior eliminação das EROs, o chá atuou diminuindo o estresse oxidativo nessa glândula. O consumo do chá de camomila, possui efeitos benéficos tanto para o controle da glicemia como para o estado antioxidante no diabetes. Isto pode ser explicado através da ação dos flavonoides presentes no chá de camomila com efeitos antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim as células dos radicais livres e, portanto, da peroxidação lipídica (80). Pode-se sugerir, portanto, que a presença dos flavonoides no chá administrado pode ter agido no sistema antioxidante enzimático e não enzimático da glândula submandibular no grupo diabético tratado, prevenindo a peroxidação lipídica, no entanto, aumentou somente a via enzimática da parótida diminuindo a peroxidação lipídica no grupo diabético tratado em comparação ao diabético não tratado.

O presente trabalho, com o interesse de buscar novas formas de controle para o diabetes, teve como objetivo a investigação do efeito do chá de camomila nos índices glicêmicos e seus possíveis mecanismos de ação. Além disso avaliar o efeito do chá nos parâmetros antioxidantes e na peroxidação lipídica das glândulas. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o mesmo apresenta atividade hipoglicemiante, agindo na diminuição da glicemia, e na redução da peroxidação lipídica na glândula parótida e, portanto, demonstrando o efeito antioxidante do chá de camomila. Com o interesse de melhor compreensão e entendimento, o presente trabalho necessita de estudos adicionais que busquem identificar melhor os mecanismos de ação do chá de camomila nos animais diabéticos induzidos por STZ, o que certamente envolve a melhor compreensão dos processos da via de sinalização da insulina, além de aprofundar o entendimento da influência do chá na absorção de nutrientes, especialmente carboidratos.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo confirma o potencial do chá de camomila como agente hipoglicemiante, regulador da polidipsia bem como seu sobre o controle de peso corporal, já que potencializou a perda no grupo diabético tratado. Este efeito poderia ser bastante conveniente para o tratamento do diabetes tipo 2 associados à obesidade e sobrepeso, porém seria um efeito colateral indesejado no tratamento do diabetes tipo 1.

Os efeitos do chá de camomila sobre a insulina não explicam a redução da glicemia, além disso, a redução p-AMPK seria outro efeito colateral indesejado logo que prejudicaria a entrada de glicose na célula.

Em relação ao efeito do tratamento com o chá de camomila sobre os parâmetros do sistema antioxidante via enzimática mostrou que a administração do chá melhorou os valores da atividade da GPx e da CAT em ambas as glândulas. Já os efeitos do chá sobre a via não enzimática (TAS) aumentou sua eficiência na glândula submandibular, porém sem efeitos na parótida. Dessa forma o chá agiria em ambas as vias do sistema antioxidante da glândula submandibular, no entanto, na glândula parótida seu efeito só foi observado na via enzimática.

Além disso pudemos confirmar o efeito antioxidante do chá de camomila na glândula parótida com a redução dos valores da peroxidação lipídica (MDA). Não foi verificado alterações nos níveis de peroxidação lipídica na glândula submandibular que poderia em função do aumento da peroxidação lipídica nas glândulas acontecer em períodos mais tardios da doença.

.

REFERÊNCIAS¹

1. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1999 Jul;341(4):248-57. doi:10.1056/NEJM199907223410406.
2. Joost HG, Wandel S, Schürmann A. Structure-function relationship of glucose transporters catalyzing facilitated diffusion. *Exp Clin Endocrinol*. 1994;102(6):434-8. doi:10.1055/s-0029-1211315.
3. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Jul;1:15019. doi:10.1038/nrdp.2015.19.
4. American Diabetes Associations. 2. Classification and diagnosis of diabetes:. *Diabetes Care*. 2018 Jan;41(Suppl 1):S13-S27. doi:10.2337/dc17-S005 .
5. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994 Jan;74(1):139-62. doi:10.1152/physrev.1994.74.1.139
6. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar;82(2):291-5.
7. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000 Feb;49(2 Suppl 1):3-8.
8. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit*. 2006 Jul;12(7):RA130-47.
9. Barry H, M GJ. Free radicals in biology e medicine. 5th ed. New York: Oxford; 2015.
10. Babu PV, Liu D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. *Curr Med Chem*. 2008;15(18):1840-50.
11. Nicolau J, de Matos JA, de Souza DN, Neves LB, Lopes AC. Altered glycogen metabolism in the submandibular and parotid salivary glands of rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Oral Sci*. 2005 Jun;47(2):111-6.
12. Arana V. Histologia e embriologia oral. São Paulo: Guanabara Koogan; 2012.
13. Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. 2008 Oct;139 Suppl:19S-24S.
14. Berg M J. Bioquímica. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014.
15. Marzzoco A. Bioquímica básica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

16. Robertson RP, Harmon JS. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free Radic Biol Med*. 2006 Jul;41(2):177-84. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.030.
17. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995 Apr;16(2):117-42.doi:10.1210/edrv-16-2-117.
18. Hall EJ. Tratado de fisiologia médica. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
19. White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem*. 1998 May;182(1-2):3-11.
20. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Apr;3(4):267-77.doi: 10.1038/nrm782.
21. Diabetesatlas.org [homepage on the internet]. Brussels Belgium. International Diabetes Federation [citado 20 mar. 2018]. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/contact.html>.
22. American Diabetes Associations. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1:S81-90.doi: 10.2337/dc14-S081.
23. Ramachandran V, Vila DM, Cochran JM, Caruso AC, Balchandani R. Acute pancreatitis secondary to hypertriglyceridemia precipitated by diabetic ketoacidosis in a previously undiagnosed ketosis-prone patient with diabetes mellitus. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2018 Mar;31(2):189-91.doi:10.1080/08998280.2018.1435123.
24. Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*. 2003 Jul;546(1):113-20.
25. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001 Dec;414(6865):813-20. doi:10.1038/414813a.
26. Chattopadhyay M, Khemka VK, Chatterjee G, Ganguly A, Mukhopadhyay S, Chakrabarti S. Enhanced ROS production and oxidative damage in subcutaneous white adipose tissue mitochondria in obese and type 2 diabetes subjects. *Mol Cell Biochem*. 2015;399(1-2):95-103. doi:10.1007/s11010-014-2236-7.
27. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov;408(6809):239-47. doi: 10.1038/35041687.
28. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol*. 1999 Sep-Oct;13(5):347-52.
29. Marnett LJ. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. *IARC Sci Publ*. 1999(150):17-27.

30. Garcia SC, Grotto D, Bulcão RP, Moro AM, Roehrs M, Valentini J, et al. Evaluation of lipid damage related to pathological and physiological conditions. *Drug Chem Toxicol*. 2013 Jul;36(3):306-12. doi: 10.3109/01480545.2012.720989.
31. Obrosova IG, Van Huysen C, Fathallah L, Cao XC, Greene DA, Stevens MJ. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J*. 2002 Jan;16(1):123-5. doi: 10.1096/fj.01-0603fje.
32. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 2001;44(2):129-46.
33. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radic Res*. 2013 Feb;47 Suppl 1:3. doi:10.1007/s001250051591.
34. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002 Sep;5(5):561-8.
35. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 1969 Nov;244(22):6049-55.
36. Kirkman HN, Gaetani GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem Sci*. 2007 Jan;32(1):44-50. doi:10.1016/j.tibs.2006.11.003.
37. MILLS GC. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem*. 1959 Mar;234(3):502-6.
38. Rellier N, Ruggiero-Lopez D, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci*. 1999;64(17):1571-83.
39. Gregório BM, De Souza DB, de Moraes Nascimento FA, Pereira LM, Fernandes-Santos C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr Pharm Des*. 2016;22(7):859-69.
40. Cemek M, Kağa S, Simşek N, Büyükkuroğlu ME, Konuk M. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Med*. 2008 Jul;62(3):284-93. doi:10.1007/s11418-008-0228-1.
41. Ganzera M, Schneider P, Stuppner H. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci*. 2006 Jan;78(8):856-61. doi: 10.1016/j.lfs.2005.05.095.
42. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res*. 2006 Jul;20(7):519-30. doi: 10.1002/ptr.1900.

43. Kato A, Minoshima Y, Yamamoto J, Adachi I, Watson AA, Nash RJ. Protective effects of dietary chamomile tea on diabetic complications. *J Agric Food Chem*. 2008 Sep;56(17):8206-11. doi:10.1021/jf8014365.
44. Eddouks M, Lemhadri A, Zeggwagh NA, Michel JB. Potent hypoglycaemic activity of the aqueous extract of *Chamaemelum nobile* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005 Mar;67(3):189-95. doi:10.1016/j.diabres.2004.07.015.
45. Zemestani M, Rafrat M, Asghari-Jafarabadi M. Chamomile tea improves glycemic indices and antioxidants status in patients with type 2 diabetes mellitus. *Nutrition*. 2016 Jan;32(1):66-72. doi:10.1016/j.nut.2015.07.011.
46. Rafrat M, Zemestani M, Asghari-Jafarabadi M. Effectiveness of chamomile tea on glycemic control and serum lipid profile in patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest*. 2015 Feb;38(2):163-70. doi:10.1007/s40618-014-0170-x.
47. Prabakaran D, Ashokkumar N. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. *Biochimie*. 2013 Feb;95(2):366-73. doi:10.1016/j.biochi.2012.10.008.
48. Panda S, Kar A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol*. 2007 Nov;59(11):1543-8. doi:10.1211/jpp.59.11.0012.
49. Nogueira FN, Santos MF, Nicolau J. Influence of streptozotocin-induced diabetes on hexokinase activity of rat salivary glands. *J Physiol Biochem*. 2005 Sep;61(3):421-7.
50. Deconte SR, Oliveira RJ, Calábria LK, Oliveira VN, Gouveia NM, Moraes AaS, et al. Alterations of antioxidant biomarkers and type I collagen deposition in the parotid gland of streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 2011 Aug;56(8):744-51. doi:10.1016/j.archoralbio.2011.01.005.
51. Cate T. *Histologia oral*. 7. ed. São Paulo: Elsevier; 2013.
52. Miletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Front Oral Biol*. 2010;14:1-20. doi:10.1159/000313703.
53. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 2001 Feb;85(2):162-9. doi:10.1067/mpr.2001.113778.
54. Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J*. 1992 Apr;172(8):305-12.
55. Baum BJ, Dai Y, Hiramatsu Y, Horn VJ, Ambudkar IS. Signaling mechanisms that regulate saliva formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1993;4(3-4):379-84.

56. Vernillo AT. Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc.* 2003;134 Spec No:24S-33S. doi:10.14219/jada.archive.2003.0366.
57. Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis.* 2004 Jul;10(4):187-200. doi:10.1111/j.1601-0825.2004.01019.x.
58. Romero AC, Ibuki FK, Nogueira FN. Sialic acid reduction in the saliva of streptozotocin induced diabetic rats. *Arch Oral Biol.* 2012 Sep;57(9):1189-93. doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.016.
59. Sabino-Silva R, Freitas HS, Lamers ML, Okamoto MM, Santos MF, Machado UF. Na⁺-glucose cotransporter SGLT1 protein in salivary glands: potential involvement in the diabetes-induced decrease in salivary flow. *J Membr Biol.* 2009 Mar;228(2):63-9.
60. Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in vitro of the submandibular salivary glands (SMG) from mice injected with isoproterenol. *Gen Pharmacol.* 1983;14(6):705-8.
61. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46.
62. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 1994 Nov;43(11):1326-33.
63. Najla OA, Olfat AK, Kholoud SR, Eneas ND, Hanan SA. Hypoglycemic and Biochemical Effects of *Matricaria Chamomilla* Leave Extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Health.* 2012 Jan;2(5):43-8.
64. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
65. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.
66. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72:248-54.
67. Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ.* 2005 Jan;172(2):213-26. doi:10.1503/cmaj.1031414.
68. Abdel-Hassan IA, Abdel-Barry JA, Tariq Mohammeda S. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* 2000 Jul;71(1-2):325-30.

69. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216-26.
70. Eid HM, Haddad PS. The antidiabetic potential of quercetin: underlying mechanisms. *Curr Med Chem*. 2017;24(4):355-64. doi:10.2174/0929867323666160909153707.
71. Villa-Rodrigues JA, Aydin E, Gauer JS, Pyner A, Williamson G, Kerimi A. Green and chamomile teas, but not acarbose, attenuate glucose and fructose transport via inhibition of GLUT2 and GLUT5. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Dec;61(12). doi:10.1002/mnfr.201700566.
72. American Diabetes Associations. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 2017 Jan;40(Suppl 1):S11-S24. doi:10.2337/dc17-S005.
73. Jacobson AM. The psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1996 May;334(19):1249-53. doi:10.1056/NEJM199605093341907.
74. Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 May;10(5):852-62. doi:10.2215/CJN.10741013.
75. Ibuki FK, Simões A, Nogueira FN. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. *Cell Biochem Funct*. 2010 Jul;28(6):503-8. doi:10.1002/cbf.1683.
76. Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2005 Mar;353(1-2):133-9. doi:10.1016/j.cccn.2004.11.004.
77. Miyake Y, Yamamoto K, Tsujihara N, Osawa T. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. *Lipids*. 1998 Jul;33(7):689-95.
78. Gauer JS, Tumova S, Lippiat JD, Kerimi A, Williamson G. Differential patterns of inhibition of the sugar transporters GLUT2, GLUT5 and GLUT7 by flavonoids. *Biochem Pharmacol*. 2018 Mar;152:11-20. doi:10.1016/j.bcp.2018.03.011.
79. Leite MF, Lima AM, Massuyama MM, Otton R. Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 2010 Jul;55(7):479-85. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.04.006.
80. Kahraman A, Erkasap N, Köken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*. 2003 Feb;183(1-3):133-42.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise do potencial antioxidante e influência no metabolismo da glicose do uso do chá de camomila nas glândulas salivares de ratos diabéticos", registrada com o nº 015/2016, sob a responsabilidade de Fernando Neves Nogueira, Bruna de Oliveira Perestrelo, Douglas Nesadal de Souza, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 20/02/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/12/2017 A 20/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico/Wistar
Nº de animais	36
Peso/Idade	200g / 45 dias
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB-USP

São Paulo, 23 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP