FERNANDO NEVES NOGUEIRA

**SISTEMA ANTIOXIDANTE E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
GLÂNDULAS SALIVARES DE RATOS DIABÉTICOS**

São Paulo
2004

FERNANDO NEVES NOGUEIRA

**Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares
de ratos diabéticos**

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

Área de Concentração: Materiais Dentários

Orientador: Prof. Dr. José Nicolau

São Paulo
2004

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nogueira FN. Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

São Paulo, / /2004

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nogueira FN. Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

RESUMO

O objetivo do presente estudo é o de verificar o efeito do diabetes na atividade de constituintes do sistema antioxidante das glândulas salivares submandibular (SM) e parótida (P) de ratos. Para indução do diabetes foi injetado em ratos, via intraperitoneal, estreptozotocina (60mg/kg de peso corporal) dissolvido em tampão citrato de sódio 0,1M pH 4,5. Quarenta e oito horas após sua indução foi determinada a glicemia no sangue dos animais. Somente aqueles ratos que apresentaram glicemia superior a 350mg de glicose/100 ml de sangue foram considerados diabéticos. Após o período experimental, os animais foram sacrificados, sendo removidas as glândulas salivares e sangue para análise. Foram determinadas, através de espectrofotometria, as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). O conteúdo de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foi determinado em HPLC. A peroxidação lipídica foi determinada no sangue e nas glândulas salivares SM e P usando o ácido tiobarbitúrico (TBARS), que reage com o malonaldeído (MDA) decorrente da peroxidação lipídica. Os resultados mostram um aumento na concentração de malonaldeído no sangue e na glândula submandibular, mas não na glândula parótida. A concentração de GSH e GSSG é maior na glândula SM em relação ao grupo controle, enquanto que a concentração de GSH é menor na glândula P. Não há diferença na atividade da enzima SOD em nenhuma das glândulas salivares. As enzimas CAT e GPx tem a

sua atividade específica aumentada somente na glândula parótida. Na glândula submandibular, nenhuma destas duas enzimas sofrem alterações nas suas atividades. Podemos concluir que o sistema antioxidante das glândulas salivares respondem de forma diferente 30 dias após a indução do diabetes. Na glândula SM não há alteração na atividade das enzimas estudadas, porém há um aumento na peroxidação lipídica. Na glândula P, há um aumento na atividade das enzimas CAT e GPx, não sendo encontrado aumento da peroxidação lipídica.

Palavras-Chave: Glândula salivar; Diabetes; Sistema antioxidante

Nogueira FN. Antioxidant system and lipid peroxidation in salivary gland of diabetic rats [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2004.

ABSTRACT

The aim of the present study is to determine the effect of diabetes in the activity of some contents from the antioxidant system of submandibular (SM) and parotid (P) salivary glands. The diabetic state was induced by an injection of streptozotocin (60mg/kg body weight) dissolved in 0,1M sodium citrate buffer pH 4,5. Forty-eight hours after the injection, blood was collected and the glycemia determined. Only those animals presenting a blood glucose above 350mg glucose/100ml blood was used in the study. Thirty days after the induction of the diabetes, the animals were sacrificed, the salivary glands were removed and blood was collected and used in the determinations. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) was determined in spectrophotometer. The content of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione was determined in HPLC. The lipid peroxidation was determined in blood and in SM and P glands, measuring the tiobarbituric acid (TBARS) which reacts with malonaldehyde (MDA) from lipid peroxidation. The results show an increase in MDA concentration from SM and blood, but not on P gland. The content of GSH and GSSG from SM gland increase, and the content of GSH from P gland decreased. There is no difference in the activity of SOD in both salivary glands. The activity of CAT and GPx from P gland increase, but in SM gland there is no difference. We can conclude that the antioxidant system from the salivary glands have different responses in diabetes state after 30 days of the induction. In SM gland, there is no difference in the

activity of the enzymes, but we have an increase in the MDA content. In P gland, we have an increase in the CAT and GPx activity, but not in MDA concentration.

Keywords: Salivary gland; Diabetes; Antioxidant system

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

HEPES	ácido (N[2-hidroxifenil]piperazina-N-[2-etanosulfônico])
NaCl	cloreto de sódio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
DTT	ditiotreitól
K ₂ HPO ₄	fosfato de potássio bibásico
NADPH	nicotinamida adenina di-nucleotídio fosfato – forma reduzida
Tris	tris-hidroximetilaminometano
KCl	cloreto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
KHCO ₃	bicarbonato de potássio
HPLC	cromatografia líquida de alta pressão

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais	26
4.2 Indução do diabetes.....	26
4.3 Obtenção do material.....	27
4.4 Análises.....	27
4.4.1 Determinação da glicemia	27
4.4.2 Atividade da SOD	29
4.4.3 Atividade da CAT.....	29
4.4.4 Atividade da GPx.....	30
4.4.5 Determinação da peroxidação lipídica	30
4.4.6 Determinação da concentração de GSH e GSSG	31
4.4.6.1 Princípio da metodologia	32
4.4.6.2 Configurações do HPLC.....	32
4.4.7 Determinação da concentração de proteína total	33
4.4.8 Análise estatística	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito é um termo que se refere à uma doença caracterizada por uma hiperglicemia crônica. Ela é classificada em dois tipos: Tipo I, anteriormente chamada de diabetes melito insulino-dependente (DMID), que acomete principalmente crianças e jovens que possuem algum distúrbio na produção de insulina, sendo caracterizada atualmente como uma doença auto-imune; e Tipo II, anteriormente chamada de diabetes melito não-insulino-dependente (DMNID), que acomete principalmente adultos obesos, com idade superior a 35 anos que geralmente adquirem resistência ao hormônio insulina (MANFREDI et al., 2004).

Os principais sintomas apresentados pelos diabéticos são: a polifagia (maior ingestão de alimento), pois como o organismo não é capaz de armazená-lo, grande parte da glicose é eliminada pela urina, a polidipsia (maior ingestão de água), devido a pressão osmótica sanguínea positiva ocasionada pela alta concentração de glicose no sangue, e por fim a poliúria, por ingerir muita água, o diabético necessita urinar constantemente (LITTLE, 2000).

O oxigênio (O_2) é uma molécula estável que atua nos organismos como um acceptor de elétrons, que é reduzido em água durante a respiração celular nas mitocôndrias. Durante o processo de redução, o oxigênio pode receber somente 1 elétron, ao invés dos 2 possíveis, gerando radicais de oxigênio, que podem causar danos celulares.

Quimicamente, a molécula de oxigênio é composta por 2 átomos de oxigênio, ligados por duas ligações covalentes, na qual 4 elétrons são compartilhados pelos 2 átomos, satisfazendo desta forma, a regra do octeto, conferindo a estabilidade da molécula. No seu último nível de energia, o O₂ apresenta 8 elétrons, sendo 2 elétrons não pareados em sua nuvem eletrônica, porém com o mesmo spin¹ (figura 1.1).

Figura 1.1 - Distribuição orbital dos elétrons da molécula de oxigênio

Todo átomo possui orbitais na sua estrutura, nos quais os elétrons estão presentes. Em cada orbital, podem estar presentes até dois elétrons, com spins iguais ou contrários.

O termo radical livre refere-se a todo elemento químico que contenha um ou mais elétrons não pareados. Conceitualmente, podemos considerar o O₂ como um radical livre, porém pelo fato desta molécula apresentar 2 elétrons com mesmo spin, a sua reatividade é diminuída, pois ela somente poderá interagir com moléculas que tenham elétrons com spins contrários ao seu, o que é mais difícil de ocorrer ao acaso na natureza (BETTERIDGE, 2000).

¹ Sentido de rotação do elétron

A mesma molécula de oxigênio pode apresentar arranjos diferentes de elétrons, o que dará origem a outras moléculas. Se os 2 últimos elétrons estiverem no mesmo orbital, ou os elétrons de orbitais diferentes apresentarem spins contrários, darão origem ao oxigênio singlete ($^1\Delta_g\text{O}_2$ e $^1\Sigma_g^+\text{O}_2$). Se a molécula nativa receber um elétron a mais, completando um orbital, dará origem ao ânion superóxido (O_2^-). Se o ânion superóxido receber mais um elétron, dará origem ao peróxido (O_2^{2-}), como podemos ver na figura 1.2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003).

Figura 1.2 - Possíveis distribuições eletrônicas da molécula de oxigênio

Esses compostos são conhecidos como Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

As EROs podem agir de várias maneiras no organismo, promovendo a desnaturação de proteínas e/ou a peroxidação lipídica.

O organismo dispõe de mecanismos chamados de sistemas antioxidantes, que são capazes de prevenir os danos que estas espécies reativas de oxigênio poderiam causar no organismo. Os mecanismos são divididos em sistema enzimático, composto pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx); e pelo sistema não enzimático, como a vitamina E, vitamina C, carotenóides entre outros (GATE et al., 1999).

O distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor da formação de danos é chamado de dano oxidativo ou estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003).

O estresse oxidativo tem sido classificado em 3 categorias: leve, sendo aquele no qual os tecidos estão sendo constantemente expostos; moderado, causado por um aumento do estresse oriundo de fontes externas, como a radiação, podendo levar a danos no DNA, daí a necessidade de sua prevenção; e o estresse intenso que resulta num dano permanente, como ocorre no enfarto severo (FLOYD, 1997).

No diabetes melito existem consideráveis evidências de que o dano oxidativo está aumentado, embora seu mecanismo ainda não esteja muito claro (WEST, 2000). Uma das teorias é a de que o aumento da concentração de açúcares no organismo causaria a glicosilação de macromoléculas, o qual leva a uma modificação não enzimática destas diminuindo sua função biológica. Nesse processo são gerados radicais livres que agirão por todo organismo promovendo o dano oxidativo (RELLIER et al., 1999).

Em glândulas salivares são poucas as informações sobre o dano oxidativo no diabetes, razão que nos leva à busca por respostas neste estudo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O diabetes melito é uma doença cujos relatos estão descritos desde o ano 1500 a.c., no antigo Egito. Os gregos, no século II, faziam referências a uma doença. Chamada diabetes, era caracterizada como uma “estranha doença em que a carne e os ossos fluem juntos pela urina”, levando o indivíduo à morte. No século VI, os indianos identificaram a substância doce na urina como sendo glicose e com isso adicionada a palavra “melito” ao diabetes (NOTKINS, 1979).

No final do século XIX, a causa do diabetes foi identificada por dois pesquisadores austríacos. Oscar Minkowski e Baron Joseph Von Mering, em 1889, identificaram no pâncreas a causa do diabetes, pois após a remoção desse órgão em cães normais, estes apresentaram os sintomas da doença. Portanto, a partir desta data, foram iniciados os estudos do diabetes melito.

No ano de 1921, os canadenses Frederick G. Banting e Charles H. Best mostraram que alguma substância do pâncreas seria a responsável pela prevenção do diabetes. Ao injetarem extrato de pâncreas em cães diabéticos, a glicemia dos animais foi reduzida. Dessa forma foi possível iniciar o tratamento dos indivíduos que eram acometidos pela enfermidade.

Na odontologia, a pesquisa sobre a influência do diabetes nos tecidos orais foi iniciada somente em meados do século passado, quando Liu e Lin

(1969b) verificaram que em ratos afetados pelo diabetes ocorria um retardo² no desenvolvimento corporal e glandular (tanto na glândula submandibular quanto na glândula parótida). Os animais em desenvolvimento tratados com insulina, durante o período experimental (período não relatado), não apresentaram este retardo. Em animais adultos foi observada uma redução dos pesos glandulares e dos diâmetros dos ductos da glândula submandibular. Esse trabalho mostrou a importância da insulina no desenvolvimento e manutenção da função das glândulas salivares.

No mesmo ano, Liu e Lin (1969a) confirmaram a importância da insulina no desenvolvimento corporal e glandular em animais diabéticos ao mostrarem que somente com a administração de hormônio do crescimento (GH) não foi possível a obtenção de valores normais de desenvolvimento, o que foi conseguido com a administração deste hormônio junto com a insulina.

Desde então, as pesquisas com diabetes foram desenvolvidas correlacionando a presença ou ausência da insulina na atividade e função das glândulas salivares e da saliva.

Em glândulas parótidas de ratos, o estado diabético induzido tanto por aloxana quanto por estreptozotocina causou uma redução na atividade da enzima amilase na glândula (ANDERSON, 1983, ANDERSON; BEVAN, 1992, ANDERSON; JOHNSON, 1981; KIM et al., 1990, SZCZEPANSKI; MEDNIEKS; HAND, 1998) e na saliva (ANDERSON; JOHNSON, 1981). Porém, quando esses animais foram tratados com insulina, a atividade da enzima retornou a valores

² Como retardo entende-se um menor ganho de peso do animal ou do peso relativo da glândulas e do diâmetro do seu ducto.

normais (ANDERSON, 1983; KIM et al., 1990, SZCZEPANSKI; MEDNIEKS; HAND, 1998).

Na glândula submandibular de ratos, o estado diabético induzido por aloxana causou redução da atividade da enzima peroxidase tanto na glândula quanto na saliva (ANDERSON; SHAPIRO, 1979).

A influência do estado diabético na secreção salivar em humanos apresenta resultados conflitantes. Connere, Iranpour e Mills (1970) relataram, uma redução no fluxo salivar da glândula parótida em adultos diabéticos comparada a um grupo controle, quando estimulada com ácido acético. Nesse estudo, os autores descrevem que “não está claro se a xerostomia é o resultado da redução da função da glândula salivar ou uma disfunção, se está relacionada com distúrbios metabólicos remotos provenientes da cavidade oral, representando não necessariamente uma redução da atividade da glândula salivar, ou se existe uma base psíquica”. Redução de fluxo foi relatada também por outros autores (BANOCZY et al., 1987; CHAVEZ et al., 2000; HARRISON; BOWEN, 1987; KJELLMAN, 1970; THORSTENSSON et al., 1989).

Nenhuma redução do fluxo salivar foi confirmada nos estudos de Cherry-Peppers et al. (1992), Dodds e Dodds (1997), Marder, Abelson e Mandel (1975), Meurman et al. (1998), Sharon et al. (1985), Streckfus et al. (1994), Tenovuo et al. (1986a), Tenovuo et al. (1986b), Lamey, Fisher e Frier (1986).

Nos pacientes diabéticos, o controle da glicemia é um dos objetivos do tratamento, o que nem sempre é conseguido.

Nenhuma relação entre concentração de glicose sanguínea e a salivar foi encontrada por Sharon et al. (1985) ao compararem essas concentrações em pacientes adultos diabéticos e controles.

O controle da glicemia em pacientes diabéticos foi estudado por Dodds e Dodds (1997), no qual os autores mostraram não haver alteração nos fluxos da saliva total não estimulada, saliva da parótida estimulada e sua concentração de proteínas. Nesse estudo foram utilizados grupos diabético com glicemia controlada, diabético com glicemia não controlada e grupo controle. Somente a atividade da enzima amilase, que apresentou aumento na atividade no grupo com glicemia não controlada, teve a sua atividade reduzida com o controle da glicemia.

Chavez et al. (2000) encontraram redução do fluxo salivar da saliva total não estimulada, saliva da parótida estimulada e não estimulada em pacientes diabéticos com controle pobre da glicemia quando comparada a pacientes bem controlados, associando o controle da glicemia com a disfunção salivar em pacientes adultos.

O aumento da glicemia está diretamente associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio em outros tecidos. Esse excesso de glicose pode causar a glicação de proteínas, processo este conhecido como “reação de Maillard” (BAYNES; THORPE, 1999). A glicação de proteínas é o primeiro passo para a obtenção da coloração marrom de compostos formados quando aquecemos misturas de carboidratos e aminas, comuns no cozimento. Nesse processo, a molécula de glicose pode ligar-se ao radical amino da estrutura de uma proteína, gerando um composto conhecido como “Produto Amadori”. Esse composto pode sofrer uma oxidação (por EROs, por exemplo), formando os produtos avançados de glicação, conhecidos também como AGEs (advanced glycation end-products) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003). A glicação de proteínas pode levar à inativação de enzimas, incluindo as enzimas do sistema antioxidante do organismo (RELLIER et al., 1999). A N-carboximetilisina é um

exemplo de AGEs formado pela glicação de hemoglobina, que pode sofrer oxidação tanto pela molécula de oxigênio quanto pelo íon ferro (figura 2.1).

Figura 2.1 – Formação da N-Carboximetilisina a partir da molécula de glicose

Uma outra consequência do excesso de moléculas de glicose no sangue seria a da molécula de glicose sofrer uma auto-oxidação, através da enolização, gerando um radical enediol. Este radical enediol transfere seu elétron não pareado a uma molécula de O₂, gerando um ânion superóxido e uma dicarbonila (figura 2.2). A dicarbonila liga duas cadeias protéicas formando uma ligação cruzada entre elas e inativando-as (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003; WOLFF; DEAN, 1987).

A glicação de proteínas causa uma perda da função desta. A enolização da molécula de glicose tem como consequência o aumento na geração de EROs, que podem levar a uma peroxidação lipídica, que consiste da ligação desta ERO a uma ligação insaturada de um ácido graxo, modificando a sua estrutura e,

quando submetido ao calor ou hidrólise, leva a formação de malonaldeído e a outros produtos finais.

Figura 2.2 – Processo de auto-oxidação de um monossacarídeo

fosforila o complexo enzimático citoplasmático e remove a proteína $p40^{\text{phox}}$, permitindo que o complexo citoplasmático ligue-se ao complexo da membrana, ativando a enzima (PITHON-CURI et al., 2002).

O aumento da atividade dessa enzima, estimulado pelo aumento da atividade da PKC em musculatura lisa e endotélio, levou a um aumento da geração de EROs. Quando a NADPH oxidase foi inibida, houve uma redução significativa na geração de EROs nesses tecidos (INOGUCHI et al., 2000).

Em ilhotas pancreáticas, o aumento da glicemia levou a um aumento na geração de ERO via NADPH oxidase, sendo que este aumento foi inibido por inibidores desta enzima (OLIVEIRA et al., 2003).

Esses estudos mostraram a importância da glicemia na geração de EROs. Para eliminar esses EROs, o organismo possui enzimas específicas para esse fim (MATES; SANCHEZ-JIMENEZ, 1999).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima na eliminação do ânion superóxido. Essa enzima possui duas isoformas. A CuZnSOD, ligada aos íons cobre e zinco, e a MnSOD, ligada ao íon manganês. A CuZnSOD apresenta-se no citoplasma das células e a MnSOD em suas mitocôndrias. A função é comum às duas formas: converter O_2^- em H_2O_2 .

A enzima Catalase (CAT) é uma enzima presente em toda célula, cuja função é converter H_2O_2 em H_2O e O_2 .

A enzima glutathiona peroxidase (GPx) é uma proteína com 80Kda, com 4 sub-unidades iguais, possuindo também a mesma função de converter H_2O_2 em H_2O . Nesse processo, a enzima reduz 2 glutathionas reduzidas (GSH) gerando uma glutathiona oxidada (GSSG) tendo água como subproduto (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003).

O tripeptídeo γ -glutamil-cisteinil-glicina, ou glutathiona (GSH) é encontrado em todas as células do organismo e desempenha uma variedade de papéis. O fato da glutathiona possuir um grupo sulfidril livre é importante pois protege os grupos essenciais de proteínas. Esse grupo sulfidril interage com o radical livre para formar um radical glutathiona, que dimeriza para formar a glutathiona oxidada (GSSG).

Os relatos relacionando o estado diabético às atividades de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) apresentaram resultados diversos em vários tecidos estudados.

Em coração de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina houve aumento na atividade da enzima SOD (KAKKAR et al., 1995), o que não foi confirmado por outros autores (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987), aumento na atividade da enzima CAT (GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; WOHAIEB; GODIN, 1987) e nenhuma diferença significativa na atividade da enzima GPx (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987) quando comparadas as do grupo controle. A peroxidação lipídica, que reflete lesão celular, foi maior no grupo diabético, considerada pela maior concentração de malonaldeído, detectado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (KAKKAR et al., 1995).

Em rins de ratos diabéticos, a redução na atividade da enzima SOD foi mostrada por alguns autores (GODIN et al., 1988; LOVEN et al., 1986; WOHAIEB; GODIN, 1987). Contrariamente, o aumento da atividade total da enzima SOD foi observado por outros (KAKKAR et al., 1997; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003), os quais mostraram que além do aumento da atividade da enzima SOD, houve um aumento da concentração do RNAm da CuZnSOD. Os autores não determinaram a concentração do RNAm da MnSOD. A atividade da enzima CAT foi menor em animais diabéticos que nos controle (GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1997; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003; WOHAIEB; GODIN, 1987), porém, outros autores encontraram aumento na atividade da CAT nos animais diabéticos quando comparada a do grupo controle (UGOCHUKWU; COBOURNE, 2003). O aumento na atividade da enzima GPx no estado diabético foi evidenciado por diversos autores (DOHI et al., 1988; GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; KAKKAR et al., 1997; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003; MAK et al., 1996; UGOCHUKWU; COBOURNE, 2003; WOHAIEB; GODIN, 1987). O aumento da atividade da enzima GPx pode ser uma resposta fisiológica

compensatória à redução da atividade da enzima CAT (KAKKAR et al., 1997; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003). Em relação ao conteúdo total de glutathiona, não foi encontrada alteração na sua concentração (UGOCHUKWU; COBOURNE, 2003), porém Mak et al. (1996) observaram um aumento do seu conteúdo no estado diabético. Apesar de Limaye, Raghuram e Sivakami (2003) observarem aumento de cerca de 50% no conteúdo de malonaldeído, Ugochukwu e Cobourne (2003) não mostraram alteração na concentração de malonaldeído em ratos diabéticos.

Em fígado de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, a atividade da enzima SOD foi menor que a do grupo controle (GODIN et al., 1988; LOVEN et al., 1986; SAXENA et al., 1993), assim como a atividade da enzima CAT (GODIN et al., 1988, SAXENA et al., 1993; WOHAIEB; GODIN, 1987). Somente 2 autores mostraram aumento nas atividades destas duas enzimas (KAKKAR et al., 1995; CHO et al., 2002). A atividade da enzima GPx também foi menor no grupo diabético quando comparado ao controle (GODIN et al., 1988; SAXENA et al., 1993, WOHAIEB; GODIN, 1987), porém Mak et al. (1996) não observaram essa redução. Em relação ao conteúdo de glutathiona, a concentração de GSH foi menor (SAXENA et al., 1993, WOHAIEB; GODIN, 1987) e a de GSSG não foi alterada (SAXENA et al., 1993) no estado diabético quando comparada ao grupo controle. Aumento do conteúdo de compostos que reagiram com o ácido tiobarbitúrico foi maior, mostrando um aumento no dano lipídico desses animais quando comparados ao grupo controle (FEILLET-COUDRAY et al., 1999).

Em pâncreas de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, a atividade da enzima SOD foi maior (GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; WOHAIEB; GODIN, 1987), assim como a da enzima CAT (GODIN et al., 1988;

KAKKAR et al., 1995; WOHAIEB; GODIN, 1987). Não houve alteração na atividade da enzima GPx (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987) e na concentração de GSH (WOHAIEB; GODIN, 1987) quando comparadas aos animais do grupo controle.

No sangue de ratos diabéticos, as atividades das enzimas SOD e CAT não apresentaram alteração (GODIN et al., 1988), o que não foi confirmado por outros autores que encontraram aumento na atividade da CAT (KAKKAR et al., 1995; TORRES; CANAL; PEREZ, 1999). A enzima GPx apresentou sua atividade elevada (GODIN et al., 1988; QUJEQ; ALIAKBARPOUR; KALAVI, 2004), assim como a concentração de malonaldeído, quando comparadas aos animais do grupo controle (DOMINGUEZ et al., 1998; KAKKAR et al., 1995; QUJEQ; ALIAKBARPOUR; KALAVI, 2004).

Nos estudos com animais, o tratamento com insulina ou com drogas hipoglicêmicas possibilitou o retorno da atividade das enzimas a valores normais (CHO et al., 2002; GODIN et al., 1988; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003; LOVEN et al., 1986; UGOCHUKWU; COBOURNE, 2003; WOHAIEB; GODIN, 1987).

A divergência dos resultados pode ser devido ao tempo de indução, que varia de 10 dias a 8 meses. O tempo de indução do diabetes influencia na atividade das diversas enzimas do sistema antioxidante (OBERLEY, 1988).

No sangue de pacientes diabéticos, tanto do tipo I quanto do tipo II, houve aumento na atividade da enzima SOD e na concentração de malonaldeído, porém, a enzima GPx não sofreu alteração na sua atividade e a concentração de GSH foi menor quando comparadas ao grupo controle (GODIN et al., 1988; SEGHRUCHNI et al., 2002). A concentração de malonaldeído foi maior no grupo

diabético quando comparada ao grupo controle, o que mostra um aumento no estresse oxidativo no sangue de pacientes diabéticos (MATTEUCCI; GIAMPIETRO, 2000; MARTIN-GALLAN et al., 2003).

Torna-se evidente até o presente momento a importância no organismo do efeito do diabetes na atividade do sistema antioxidante.

Em glândulas salivares os dados são muito escassos.

A modulação da atividade da enzima SOD em glândulas submandibulares de ratos foi mostrada por Barroso, Quissell e Colepicolo (2003). Os autores demonstraram que o estímulo β -adrenérgico com injeção de isoproterenol leva a um aumento na atividade total da enzima SOD, sendo que a principal isoforma responsável por esse aumento é a MnSOD. Além disso, após esse mesmo estímulo há um aumento na relação GSH/GSSG, sem especificar se houve um aumento na concentração de GSH ou uma diminuição da concentração de GSSG.

A importância da enzima SOD na proteção contra danos oxidativos gerados após irradiação foi demonstrada por Nagler et al. (2000) na qual a injeção intraperitonal de CuZnSOD e MnSOD prévia à irradiação promoveu a proteção da função glandular somente na glândula parótida de ratos, sendo que a isoforma ligada ao manganês foi a principal responsável por esse efeito. A glândula submandibular não sofreu a proteção por essa enzima.

Na saliva, Nagler et al. (2002), analisando atividade da enzima SOD, peroxidase, ácido úrico e o status antioxidante total mostraram que a principal fonte destes antioxidantes salivares é a glândula parótida, cuja contribuição na saliva é muito maior quando comparada à das glândulas submandibular e sublingual somadas, principalmente em repouso.

Em pacientes diabéticos foi demonstrada a redução na atividade da enzima SOD na saliva total coletada em repouso, o que poderia ser consequência da glicosilação desta proteína (BELCE et al., 2000).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo dessa investigação foi estudar a influência do estado diabético num experimento de curta duração (30 dias), sobre as glândulas submandibular e parótida de ratos tratados com estreptozotocina. Para isso, os seguintes parâmetros foram estudados:

- Presença de dano lipídico através da Peroxidação Lipídica
- Atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD)
- Atividade da enzima Catalase (CAT)
- Atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx)
- Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)
- Concentração de Glutathione Oxidada (GSSG)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Ratos adultos (180 – 220 g) da raça Wistar foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o período experimental, com livre acesso a água e alimento. Os ratos foram divididos em grupos controle e experimental, sendo sacrificados 30 dias após a indução do diabetes por destroncamento crânio-cervical. Os pesos dos animais foram anotados no início e fim da fase experimental.

Este estudo teve seu protocolo de pesquisa aprovado pela Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP, parecer 03/04 (Anexo A).

4.2 Indução do Diabetes

Após o período de jejum de uma noite (aproximadamente 15 horas), os animais receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso

corporal) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M em pH 4,5. Os animais do grupo controle receberam somente o veículo.

4.3 Obtenção do material

Após o sacrifício dos animais, as glândulas salivares submandibular e parótida foram imediatamente extraídas, removendo-se o tecido aderente, prensadas em placas de alumínio previamente mantidas em gelo seco e conservadas em freezer à – 80°C até o momento do uso. Os pesos glandulares foram determinados no dia da utilização. O peso glandular relativo foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{PGR} = \frac{\text{peso glandular} \times 100}{\text{peso corporal}}$$

4.4 Análises

4.4.1 Determinação da glicemia dos animais

A glicemia dos animais foi determinada 48 horas após a administração de estreptozotocina através do sistema Accu-CheK[®] Blood Glucose Meter³, sendo considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia maior do que 350mg de glicose/100ml de sangue. No dia do sacrifício, a glicemia foi novamente medida, sendo utilizados os animais que apresentaram valores de glicemia maiores do que 350mg de glicose/100ml de sangue.

4.4.2 Atividade da SOD

As glândulas salivares foram homogeneizadas a 10% (100mg/ml) em tampão Hepes 25mM, NaCl 300mM, MgCl₂ 1,5mM, EDTA 0,2mM, DTT 0,5mM, β -glicerofosfato 20mM, Triton X-100 0,1% e inibidores de protease⁴. O homogenado permaneceu em gelo por 20 minutos e após esse período foi centrifugado a 12.800g (10.000 rpm) por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante da centrifugação foi utilizado no ensaio, sendo descartado o precipitado. A atividade da SOD foi determinada utilizando o método descrito por Mccord e Fridovich (1968): utiliza-se no meio de reação a hipoxantina, a enzima xantina oxidase e o citocromo C. Nesta reação, que ocorre em condições aeróbicas, a enzima xantina oxidase atua sobre a hipoxantina gerando O₂^{•-}. Esse ânion age sobre o citocromo C, reduzindo o Fe³⁺ à Fe²⁺, que pode ser visualizada espectrofotometricamente a 550nm, que é o comprimento de onda relativo ao pico de absorbância do citocromo C - Fe²⁺. A

³ Roche Diagnostics Gmgh, Alemanha.

SOD captura o $O_2^{\bullet-}$, inibe a formação de Fe^{2+} , podendo ser acompanhada na curva. Essa curva foi monitorada por 5 minutos. Nesse ensaio, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que promove 50% de inibição da redução do citocromo C à 25°C em pH 7,8. O meio de reação foi composto de 55µM de hipoxantina, 22,5mM de citocromo C e um volume variado do homogenado glandular e tampão fosfato 0,1M , pH 7,8. A reação foi iniciada pela adição de xantina oxidase (0,3U/ml).

4.4.3 Atividade da Catalase

As glândulas salivares foram homogeneizadas a 10% (100mg/ml) em tampão fosfato 50mM pH 7,4⁵ e o homogenado centrifugado a 1.500g (4000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio. A atividade da catalase foi determinada seguindo o método de Aebi (1984) o qual baseia-se no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 , determinada espectrofotometricamente a 240nm durante 5 minutos. O meio de reação foi composto de 898µl de tampão fosfato 50mM pH 7,4 e 2 µl de homogenado glandular. A reação foi iniciada com a adição de 100µl de H_2O_2 100mM. (ϵ catalase=0,071 $mM^{-1} cm^{-1}/1U$).

⁴ Antipaina (20µg/ml), Leupeptina (2 µg/ml), Benzamidina (1,57 µg/ml), Pepstatina A (2 µg/ml) , O-Phenantroline (1mM), PMSF 150 µg/ml) e Aprotinina (10 µg/ml).

⁵ KH_2PO_4 50mM e K_2HPO_4 50mM 1:1,5 (v/v)

4.4.4 Atividade da GPx

As glândulas salivares foram homogeneizadas a 10% (100mg/ml) em tampão K_2HPO_4 50mM pH 7,0 e o homogenado centrifugado a 1.500g (4000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio. A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) que utiliza o peróxido de terbutila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathione redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH, a qual pode ser acompanhada em espectrofotômetro a 340nm. O meio de reação foi composto por tampão K_2HPO_4 50mM pH 7,0, EDTA 1mM, glutathione redutase 0,1U/mL, GSH 1mM e NADPH 0,2mM. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de terbutila 0,5mM e acompanhada durante 5 minutos. (ϵ NADPH=6,22 x 10³ mM⁻¹ cm⁻¹).

4.4.5 Determinação da peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica seguiu o método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990), que se baseia na determinação de malonaldeído (MDA) devido à sua reação com o ácido tio-barbitúrico (TBARS). Aldeídos sempre são produzidos em processos de peroxidação lipídica, sendo o malonaldeído o mais abundante. Cada molécula de MDA reage com 2 moléculas

de TBARS, gerando uma coloração que pode ser detectada em espectrofotômetro. As glândulas salivares foram homogeneizadas a 10% (100mg/ml) em tampão K_2HPO_4 50mM pH 7,0 e desproteinizadas em ácido tricloroacético 20%, sendo adicionado hidroxibutil-tolueno 4% (BHT) para estabilizar a reação. As amostras foram agitadas e permaneceram em gelo por 30 minutos. Decorrido esse período foram centrifugadas a 5.000g (8.000 rpm) por 2 minutos e no sobrenadante foi adicionado igual volume de TBARS 0,7%. As amostras foram aquecidas a 95°C por 45 minutos, resfriadas e lidas em espectrofotômetro a 535nm. ($\epsilon = 153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.4.6 Determinação da concentração de GSH e GSSG

A determinação foi realizada conforme Ip et al. (1996). As amostras foram homogeneizadas a 10% (100mg/ml) em tampão Tris 37,5mM e KCl 112mM pH 7,4. Após a homogeneização, foram sonicadas por 1 minuto e desproteinizadas com metade do volume de ácido perclórico a 10% e 2mM de EDTA sob agitação durante 15 minutos. Foram centrifugadas a 9.000g (10.000 rpm) por 15 minutos, separando-se 0,375ml do sobrenadante e foram, então, adicionados 0,037ml de solução fresca de ácido iodoacético (20mg/ml), 0,337ml de KOH 2M e $KHCO_3$ 2,4M. A mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Decorrido o tempo, foram adicionados 0,75ml de solução de 2,4 dinitrofluorbenzeno a 0,1% em metanol. A amostra foi incubada por 24 horas no

escuro a 4°C, centrifugada a 2.400g (5.000 rpm) por 5 minutos e filtrada em filtro Millex[®] 0,45µm⁶, sendo aplicado 1,0 ml em HPLC.

4.4.6.1 *Princípio da Metodologia*

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo que apresenta um grupo sulfidril (SH). Esse grupo sulfidril interage com um radical livre para formar um radical glutathiona, que dimeriza para formar a glutathiona oxidada (GSSG). O ácido iodoacético reage com o radical sulfidril da molécula de GSH, deixando esse composto estável, impedindo sua dimerização. A adição da molécula de 2,4 dinitrofluorbenzeno faz com que o radical benzeno dessa molécula reaja com radicais NH₂ das moléculas da GSH e da GSSG, sendo esses compostos ligados na fase estacionária da coluna do HPLC e eluídos com o aumento da concentração de sal da fase móvel.

4.4.6.2 *Configurações do HPLC*

O sistema utilizado foi fabricado pela Shimadzu, composto de 2 bombas, forno de colunas, injetor manual e leitor diodearray e programa Classe VP. A

⁶ Millipore, Brasil

coluna utilizada foi a Shim-Pack CLC-NH₂⁷ (6,0 x 150). Os tampões utilizados foram: Tampão A, composto de Metanol:Água (4:1) e Tampão B, composto de 200ml de solução 1⁸ e 800ml de Tampão A. O equipamento foi programado da seguinte forma: Fluxo de 2,0ml/min e concentração inicial do tampão B de 25%, mantida por 5 minutos. Essa concentração aumentou até 95% durante os próximos 8 minutos, mantendo-se assim por 4 minutos, voltando a concentração inicial em 1 minuto e lavando a coluna por 5 minutos, totalizando cada corrida 23 minutos. Curvas com padrões de GSH e GSSG foram realizadas no sistema com a finalidade de determinar o tempo de retenção de cada composto e possibilitar a quantificação nas amostras pelo software.

4.4.7 Determinação da concentração de proteína total

Em todos os ensaios a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), utilizando a albumina de soro bovino como padrão.

4.4.8 Análise Estatística

⁷ Shimadzu Corporation, Japão

⁸ 272g de acetato de sódio tri-hidratado, 122 mL de água e 378 mL de ácido acético glacial

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico t de Student, comparando os grupos controle e diabético e os testes de correlação, pelo teste de Pearson.

5 RESULTADOS

Os resultados estão expressos nas tabelas 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, e nas figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, e 5.9.

Na Tabela 5.1 observamos os valores de pesos corporal inicial e final, glandulares e glandular relativo. O grupo de animais diabéticos apresentou peso final estatisticamente menor quando comparado ao grupo controle (44% menor). A glândula submandibular também apresentou redução de seu peso corporal (20%), o que não ocorreu com a glândula parótida. Quando analisamos o peso glandular relativo, notamos que não há diferença estatística na glândula submandibular, enquanto que na glândula parótida observa-se um aumento nesse parâmetro.

Na Tabela 5.2 estão expressos os valores de glicemia e MDA, tanto no sangue quanto nas glândulas. A glicemia do grupo diabético esteve acima dos 350mg de glicose/100ml de sangue. Relativamente à concentração de MDA, houve uma maior concentração no sangue dos animais diabéticos e na glândula submandibular, tanto expresso por mg de proteína quanto por glândula, o que não ocorreu na glândula parótida.

Na Tabela 5.3 estão expressos os valores de GSH e GSSG. Na glândula submandibular, houve um aumento na concentração de GSH nos animais diabéticos em cerca de 200%, independente da forma como foi expressa. A concentração de GSSG também apresentou aumento na concentração no grupo

diabético, porém em menor porcentagem (130%), o que levou a um aumento na relação GSH/GSSG. Na glândula parótida, notamos uma redução na concentração de GSH de cerca de 35%, expressa em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, o que não foi acompanhado quando expresso o resultado por glândula. Ainda na glândula parótida, não houve diferença na concentração de GSSG, o que levou a uma diminuição na relação GSH/GSSG nos animais diabéticos.

Na Tabela 5.4 estão expressos os resultados das atividades das enzimas SOD e CAT. Não houve alteração na atividade da enzima SOD em nenhuma das glândulas dos animais diabéticos. Também não houve alteração da atividade da enzima CAT na glândula submandibular, porém na glândula parótida notamos um aumento de cerca de 70% na sua atividade específica nos animais do grupo diabético e de aproximadamente 52% na atividade por glândula, quando comparados ao controle.

Na Tabela 5.5 observamos os resultados da atividade da enzima GPx. Na glândula submandibular não houve alteração da sua atividade específica, porém uma redução de cerca de 50% na sua atividade quando expressa por glândula. Na glândula parótida, a atividade específica da enzima aumentou em cerca de 40% nos animais diabéticos, o que não ocorreu quando expressa a atividade por glândula.

Os Quadros 5.1 e 5.2 mostram os resultados de correlações dos resultados encontrados, tanto na glândula submandibular quanto na parótida. Os valores utilizados nesse teste foram os de atividade específica (SOD, CAT, GPx) ou concentração específica (MDA, GSH e GSSG).

As Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 mostram as correlações estatisticamente significantes nas glândulas submandibular. As correlações foram positivas para glicemia X MDA, glicemia X GSH e glicemia X GSSG.

As Figuras 5.4, 5.5, 5.6 e 5.7 mostram as correlações estatisticamente significantes na glândula parótida. As correlações foram positivas para glicemia X CAT, glicemia X GPx, GSSG X CAT e negativa para glicemia X GSH.

Tabela 5.1 – Pesos corporal inicial, final, glandular e glandular relativo (PGR) de ratos diabéticos (D) sacrificados 30 dias após a indução com estreptozotocina (60mg/kg de peso) e controles (C). Os valores expressam a Média $\pm$ DP. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Grupo	n	Peso Corporal		SM		PA	
		Inicial (g)	Final (g)	Peso (g)	PGR	Peso (g)	PGR
C	15	218 $\pm$ 19	286 $\pm$ 30	190 $\pm$ 47	0,059 $\pm$ 0,016	191 $\pm$ 38	0,066 $\pm$ 0,005
D	15	211 $\pm$ 16	168 $\pm$ 24 **	152 $\pm$ 37*	0,066 $\pm$ 0,009	170 $\pm$ 30	0,078 $\pm$ 0,018 *

Tabela 5.2 – Glicemia (mg de glicose/dl de sangue) e concentração de malonaldeído (MDA) em sangue e nas glândulas salivares submandibular (SM) e parótida (P) de ratos diabéticos (D) sacrificados 30 dias após a indução com estreptozotocina (60mg/kg de peso) e controles (C). Os valores expressam a Média $\pm$ DP. O asterisco indica diferença estatisticamente significante pelo teste t de Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Grupo	Glicemia (mg/dl)	MDA				
		Sangue (mM)	SM		P	
			μmol/mg proteína	mmol/glândula	μmol/mg proteína	mmol/glândula
C	(15) 62,3 ± 21	(5) 2,10 ± 0,82	(8) 57 ± 16	(8) 0,18 ± 0,06	(8) 63,7 ± 17,3	(8) 0,28 ± 0,06
D	(15) 491,6 ± 96,8 **	(5) 3,85 ± 1,29 *	(9) 101 ± 32 **	(9) 0,26 ± 0,08 *	(9) 71,9 ± 23,6	(9) 0,24 ± 0,07

Tabela 5.3 – Concentração de GSH e GSSG e sua relação em glândulas salivares submandibular (SM) e parótida (P) de ratos diabéticos (D) sacrificados 30 dias após a indução com estreptozotocina (60mg/kg de peso) e controles (C). Entre parênteses está o número de animais utilizados em cada experimento. Os valores expressam a Média $\pm$ DP. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Grupos	GSH			GSSG			GSH/GSSG
	$\mu\text{g/mg}$ proteína	mg/g tecido	mg/glândula	$\mu\text{g/mg}$ proteína	mg/g tecido	mg/glândula	$\mu\text{g/mg}$ proteína
SM							
C (9)	23,55 $\pm$ 4,04	0,43 $\pm$ 0,06	0,063 $\pm$ 0,028	17,01 $\pm$ 5,27	0,28 $\pm$ 0,07	0,04 $\pm$ 0,01	1,38
D (9)	70,20 $\pm$ 19,80 **	1,29 $\pm$ 0,27 **	0,227 $\pm$ 0,060 **	39,20 $\pm$ 10,10 **	0,60 $\pm$ 0,22 **	0,11 $\pm$ 0,03 **	1,79
P							
C (8)	18,00 $\pm$ 6,56	0,40 $\pm$ 0,15	0,044 $\pm$ 0,017	2,79 $\pm$ 0,83	0,063 $\pm$ 0,017	0,012 $\pm$ 0,005	6,45
D (8)	11,63 $\pm$ 2,90 *	0,25 $\pm$ 0,06 *	0,050 $\pm$ 0,016	3,02 $\pm$ 0,96	0,060 $\pm$ 0,015	0,010 $\pm$ 0,002	3,85

Tabela 5.4 – Atividade das enzimas SOD e CAT em glândulas salivares submandibular (SM) e parótida (P) de ratos diabéticos (D) sacrificados 30 dias após a indução com estreptozotocina (60mg/kg de peso) e controles (C). Os valores expressam a Média $\pm$ DP. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Grupos	n	SOD		CAT	
		U/mg proteína	U/glândula	U/mg proteína	U/glândula
SM					
C	8	14,43 ± 2,17	535 ± 221	54,10 ± 15,40	110,0 ± 90,0
D	8	15,21 ± 1,44	564 ± 129	56,60 ± 15,20	182,0 ± 37,0
P					
C	8	13,91 ± 2,47	577,0 ± 162,0	17,22 ± 5,29	64,90 ± 15,6
D	9	14,55 ± 2,53	549,0 ± 133,0	29,33 ± 8,95 **	99,20 ± 78,00 **

Tabela 5.4 – Atividade das enzimas SOD e CAT em glândulas salivares submandibular (SM) e parótida (P) de ratos diabéticos (D) sacrificados 30 dias após a indução com estreptozotocina (60mg/kg de peso) e controles (C). Os valores expressam a Média $\pm$ DP. O asterisco indica diferença estatisticamente significante pelo teste t de Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Grupos	n	SOD		CAT	
		U/mg proteína	U/glândula	U/mg proteína	U/glândula
SM					
C	8	14,43 ± 2,17	535 ± 221	54,10 ± 15,40	110,0 ± 90,0
D	8	15,21 ± 1,44	564 ± 129	56,60 ± 15,20	182,0 ± 37,0
P					
C	8	13,91 ± 2,47	577,0 ± 162,0	17,22 ± 5,29	64,90 ± 15,6
D	9	14,55 ± 2,53	549,0 ± 133,0	29,33 ± 8,95 **	99,20 ± 78,00 **

Tabela 5.5 – Atividade da enzima GPx em glândulas salivares submandibular (SM) e parótida (P) de ratos diabéticos (D) sacrificados 30 dias após a indução com estreptozotocina (60mg/kg de peso) e controles (C). Os valores expressam a Média $\pm$ DP. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$)

Grupos	n	GPx	
		mU/mg proteína	mU/glândula
SM			
C	8	4,91 ± 1,40	150,0 ± 40,0
D	9	4,94 ± 1,35	70,0 ± 16,0 **
PA			
C	9	5,04 ± 1,33	97,0 ± 30,0
D	10	7,39 ± 2,27 **	104,0 ± 20,0

glicemia	MDA	GSH	GSSG	CAT	SOD	GPx
glicemia	**	*	*	ns	ns	ns
MDA		ns	ns	ns	ns	ns
GSH			ns	ns	ns	ns
GSSG				ns	ns	ns
CAT					ns	ns
SOD						ns

Quadro 5.1 – Correlação entre os resultados obtidos na glândula submandibular segundo o teste de Pearson. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student (* p<0,05 e **p<0,01)

glicemia	MDA	GSH	GSSG	CAT	SOD	GPx
glicemia	ns	*	ns	*	ns	**
MDA		ns	ns	ns	ns	ns
GSH			ns	ns	ns	ns
GSSG				*	ns	ns
CAT					ns	ns
SOD						ns

Quadro 5.2 – Correlação entre os resultados obtidos na glândula parótida segundo o teste de Pearson. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa pelo teste t de Student (* p<0,05 e **p<0,01)

Figura 5.1 – Correlação entre glicemia (mg/dl) e MDA ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína) na glândula submandibular segundo o teste de Pearson ($r=0,801$ e $p=0,001$)

Figura 5.2 – Correlação entre glicemia (mg/dl) e GSH ($\mu\text{g/mg}$ de proteína) na glândula submandibular segundo o teste de Pearson ($r=0,799$ e $p=0,016$)

Figura 5.3 – Correlação entre glicemia (mg/dl) e GSSG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) na glândula submandibular segundo o teste de Pearson ($r=0,682$ e $p=0,015$)

Figura 5.4 – Correlação entre glicemia (mg/dl) e GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) na glândula parótida segundo o teste de Pearson ($r=-0,653$ e $p=0,041$)

Figura 5.5 – Correlação entre glicemia (mg/dl) e CAT (U/mg de proteína) na glândula parótida segundo o teste de Pearson. ($r=0,628$ e $p=0,016$)

Figura 5.6 – Correlação entre glicemia (mg/dl) e GPx (mU/mg de proteína) na glândula parótida segundo o teste de Pearson ($r=0,719$ e $p=0,001$)

Figura 5.7 – Correlação entre CAT (U/mg de proteína) e GSSG ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) na glândula parótida segundo o teste de Pearson. ($r=0,564$ e $p=0,036$)

6 DISCUSSÃO

Durante o período experimental, os animais do grupo controle mostraram ganho de cerca de 30% em seu peso corporal, diferentemente dos animais do grupo experimental, cuja perda de peso foi de aproximadamente 20%. Da mesma forma, houve uma redução do peso médio da glândula submandibular de cerca de 20%, porém, apesar de haver um aumento de 16% no peso glandular relativo (PGR) desta glândula, este último valor não foi estatisticamente significativo. Na glândula parótida dos animais diabéticos a redução de 10% no seu peso médio não foi estatisticamente significativa, porém o aumento em 18% do seu PGR sugere um aumento de tamanho, provocado por hiperplasia glandular ou hipertrofia das suas células, como já fora observado por Anderson e Johnson (1981) e Nogueira (2001).

A glicemia dos animais diabéticos mostra valores seis vezes maior ao do grupo controle, caracterizando a hiperglicemia do grupo diabético.

O aumento da glicemia vem sendo responsabilizado pela geração de EROs (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1990; KENNEDY; LYONS, 1997; OPARA, 2004). Esse excesso de glicose pode levar a glicação de proteínas, que leva a inativação de enzimas. A glicose pode sofrer uma auto-oxidação, gerando nesse processo ânions superóxido, ou ainda, ativar a enzima NADPH oxidase, que reduz o NADPH, gerando também nessa reação o ânion superóxido. O ânion

superóxido pode causar a peroxidação lipídica, desestruturando as membranas celulares, interferindo na atividade celular e danificando tecidos.

As EROs influenciam ainda na expressão de fatores de crescimento e citocinas, regulando o crescimento e proliferação celular, sendo essa uma das formas de desenvolvimento de patologia renal do diabetes (FORBES et al., 2003).

Para combater essas EROs, o organismo dispõe de sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é composto por três enzimas.

A primeira enzima é a SOD, que apresenta duas isoformas, a MnSOD, localizada nas mitocôndrias, e a CuZnSOD, localizada no citoplasma das células. Essa enzima é responsável pela seguinte reação:

A enzima SOD é a primeira defesa celular que protege as células contra as EROs e seus derivados, sendo a CuZnSOD a principal isoforma. Essa enzima pode ser induzida em algumas condições, sendo como um dos exemplos o estresse oxidativo (DOMINGUEZ et al., 1998).

A atividade da enzima SOD pode ser inibida pelo peróxido de hidrogênio (BHUYAN; BHUYAN; PODOS, 1986). Bray et al. (1974) mostraram que altas concentrações de peróxido de hidrogênio podem causar redução da atividade da enzima SOD, o que foi confirmado por outros autores (BHUYAN; BHUYAN; PODOS, 1986; DOMINGUEZ et al., 1998; KAKKAR et al., 1995). Esse peróxido de hidrogênio pode ser proveniente do acúmulo de produtos gerados pela enzima, ou através de glicação de proteínas, conforme mostrado por Jiang et al. (1990),

que incubando proteínas com glicose mostraram um aumento na geração de peróxido de hidrogênio.

O metabolismo de lipídios também leva à síntese de peróxido de hidrogênio (HORIE; ISHII; SUGA, 1981). Existe um acúmulo maior de lipídios nas glândulas salivares maiores em ratos no estado diabético (ANDERSON; GARRETT, 1986) e os ácidos graxos circulantes influenciam na sua composição nas glândulas salivares (ALAM; SHI, 1997; AVULA; FERNANDES, 1999).

A lipidemia presente nos estado diabético pode também ser responsabilizada pelo aumento na concentração de ácidos graxos circulantes, o que poderia aumentar a susceptibilidade à peroxidação lipídica também nas glândulas salivares.

O excesso de peróxido de hidrogênio foi associado à disfunção endotelial em aorta (KARASU, 1999; LAIGHT; CARRIER; ANGGARD, 2000) o que poderia contribuir também para a redução da atividade das glândulas salivares no estado diabético.

O efeito da glicose sobre a atividade de SOD foi demonstrado em células pancreáticas isoladas incubadas com concentrações altas de glicose, na qual observou-se aumento na atividade da enzima (OLIVEIRA; CURI; CARPINELLI, 1999). Contrariamente, Oberley (1988) afirma que há perda de atividade dessa enzima em função do tempo do diabetes, devido a glicação de proteínas. Adachi et al. (1991) e Fattman, Schaefer e Oury (2003) mostraram que a SOD extracelular (EC-SOD) sofre glicação em 2 resíduos de aminoácidos do sítio ativo: Lys-122 e Lys-128. Essa glicação não diminui a sua atividade, porém diminui a afinidade da enzima por heparina, o que dificulta a sua ligação ao glicocálix, diminuindo a sua capacidade de proteção em endotélios.

Foi observado em glândula submandibular de ratos que o tratamento com isoproterenol, um agonista β -adrenérgico, causou um aumento de atividade da isoforma MnSOD, elevando a atividade total da SOD (BARROSO; QUISSELL; COLEPICOLO, 2003). Não existem relatos na literatura do efeito do diabetes na atividade dessa enzima em glândulas salivares de ratos.

Em nosso estudo, não foi possível observar alteração da atividade da enzima SOD nas glândulas salivares dos animais experimentais 30 dias após a indução do diabetes. Esses resultados sugerem que esta enzima não está respondendo positivamente ao aumento da geração de ERO, possibilitando um aumento dos danos causados por eles.

A determinação da atividade da enzima SOD em outros tecidos mostra resultados conflitantes.

Em rins de ratos, a redução de atividade de SOD foi observada 10 dias após a indução do diabetes (LOVEN et al., 1986). A mesma redução foi observada em ratos sacrificados 12 semanas após a indução do diabetes (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987). Nesses dois últimos estudos, os autores determinaram somente a CuZnSOD, e não a atividade total da SOD. Kakkar et al. (1997) mostraram que no diabetes a atividade total da SOD aumenta na primeira semana e permanece assim até a sexta semana do período experimental, porém há uma pequena redução da atividade com o decorrer do tempo. Os autores mostraram que a isoforma responsável pelo aumento da atividade nos rins é a CuZnSOD, sendo que a MnSOD não sofreu alteração. Limaye, Raghuram e Sivakami (2003) confirmaram estas observações, mostrando que após 6 semanas houve um aumento na atividade total da SOD em rins de ratos diabéticos. Esses autores observaram também um aumento nos níveis de RNAm da CuZnSOD.

Nenhuma alteração na atividade foi encontrada por Ugochukwu e Cobourne (2003) 14 dias após a indução do diabetes. Apesar dos resultados conflitantes, os autores não discutem essas diferenças e sugerem que as alterações podem estar relacionadas ao nível de RNAm da MnSOD, não determinado em nenhum dos estudos.

Um aumento de atividade da SOD também foi observado em coração de ratos diabéticos sacrificados 10 semanas após a indução do diabetes (KAKKAR et al., 1995). Wohaieb e Godin (1987) e Godin et al. (1988) não observaram redução da atividade da SOD 12 semanas após a indução do diabetes.

A atividade da SOD em fígado esteve reduzida 10 dias (LOVEN et al., 1986), 3 semanas (SAXENA et al., 1993) e 12 semanas após a indução do diabetes (GODIN et al., 1988). KAKKAR et al. (1995) observaram aumento da atividade 10 semanas após a indução do diabetes.

Em pâncreas de ratos foi encontrado aumento da SOD em ratos sacrificados 10 semanas (KAKKAR et al., 1995) e 12 semanas após a indução do diabetes (GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; WOHAIEB; GODIN, 1987).

Esses resultados mostram a dificuldade e complexidade do estudo das enzimas do sistema antioxidante, cuja atividade varia conforme o tecido estudado e o tempo de indução do diabetes.

As glândulas salivares, submandibular e parótida, possuem características histológicas, secreções, regulação e metabolismo diferentes.

A glândula submandibular é uma glândula mista, que apresenta ácinos serosos ou mucosos com semi-lua serosas (TEN CATE, 1994). Secretam uma saliva com composição mista (EDGAR, 1992) e seu metabolismo já foi caracterizado como anaeróbico (NICOLAU; SASSAKI, 1976). Sua secreção

ocorre em todo o período do dia, sendo junto com a glândula sublingual as principais responsáveis pela produção de saliva em períodos de repouso (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

A glândula parótida é uma glândula serosa que apresenta ácinos serosos, que secretam uma saliva também serosa (TEN CATE, 1994). Seu metabolismo é aeróbico (NICOLAU; SASSAKI, 1976) e sua atividade dá-se principalmente nos períodos de estímulo, quando essa glândula passa a ser a principal responsável pela produção de saliva (EDGAR, 1992; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

Os animais diabéticos apresentam hiperfagia, isto é, aumento do consumo de alimento. A hiperfagia ocasiona maior frequência na mastigação de alimentos resultando em maior estimulação mecânica das glândulas salivares. Um dos estímulos para a secreção de proteínas nas glândulas salivares é o estímulo β -adrenérgico. Podemos especular que nos animais diabéticos haja uma ativação da isoforma MnSOD, elevando a atividade total da enzima, enquanto que, a isoforma CuZnSOD, principal responsável pela proteção contra estresse oxidativo, esteja reduzida, explicando desta forma, a não observação de diferenças.

Nagler et al. (2000), através de injeções intraperitoniais de CuZnSOD e MnSOD previamente à irradiação de ratos mostraram que somente a MnSOD promovia uma proteção parcial na glândula parótida e nenhuma das duas isoformas protegeu a glândula submandibular.

Uma outra possibilidade é a de que a enzima SOD sofra um aumento na atividade nos períodos iniciais e redução nos posteriores, conforme observado em sangue de crianças e adolescentes diabéticos (DOMINGUEZ et al., 1998), devido

à sua glicação. Estudos com tempos menores e maiores de indução do diabetes são necessários para confirmar essas observações.

A segunda enzima do sistema antioxidante é a CAT, responsável por converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio:

Mais uma vez, o conflito de resultados está novamente presente, onde o tecido estudado e o tempo de indução do diabetes influenciam na atividade da enzima CAT.

Nos rins, o aumento da atividade foi observado em estudos de 14 dias de indução do diabetes, porém houve redução em estudos de 6 semanas (KAKKAR et al., 1997; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003) e 12 semanas após a indução do diabetes (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987). O estado diabético leva a uma redução da atividade da enzima CAT, porém há um aumento dos níveis de RNAm para esta enzima, sugerindo uma inibição pós-tradução (LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003).

Este mesmo padrão foi encontrado no fígado, onde após 4 semanas observou-se aumento da atividade da CAT (CHO et al., 2002), permanecendo elevada até 6 semanas após a indução do diabetes (KAKKAR et al., 1997). Após 12 semanas da indução do diabetes, houve uma redução da atividade (GODIN et al., 1988, WOHAIEB; GODIN, 1987). Contrariando este padrão, Saxena et al. (1993) mostraram uma redução da atividade 3 semanas após a indução do diabetes.

Essas observações permitem mostrar que em rim e fígado, em períodos iniciais, observamos um aumento da atividade da CAT com posterior queda da atividade. Isso mostra que o tempo de indução do diabetes pode influenciar a

atividade desta enzima, que em períodos mais posteriores há uma redução da sua atividade, devido provavelmente à sua glicação.

Em nosso estudo, a enzima CAT teve sua atividade elevada em 70% nas glândulas parótidas dos ratos diabéticos, enquanto na glândula submandibular não houve alteração. Esse aumento observado nas glândulas parótidas pode ser devido ao aumento de geração de EROs decorrente do estado diabético, propiciando a não ocorrência de danos causados por estes EROs.

O aumento da atividade da CAT foi relatado em pâncreas (GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; WOHAIEB; GODIN, 1987), coração (GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; WOHAIEB; GODIN, 1987) e em sangue de ratos diabéticos (KAKKAR et al., 1995; TORRES; CANAL; PEREZ, 1999), independente do tempo de indução do diabetes.

A terceira enzima do sistema antioxidante é a GPx, que converte o peróxido de hidrogênio em água, utilizando nesse processo duas moléculas de GSH, gerando uma molécula de GSSG:

Em coração de ratos não houve alteração da atividade da GPx (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987), tão pouco no pâncreas (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN, 1987). Foi observado aumento em rins (DOHI et al., 1988; GODIN et al., 1988; KAKKAR et al., 1995; KAKKAR et al., 1997; LIMAYE; RAGHURAM; SIVAKAMI, 2003; MAK et al., 1996; UGOCHUKWU; COBOURNE, 2003; WOHAIEB; GODIN, 1987) e em sangue de ratos diabéticos (GODIN et al., 1988; QUJEQ; ALIAKBARPOUR; KALAVI, 2004).

No fígado, foi observada redução em 3 semanas (SAXENA et al., 1993) e 12 semanas após a indução do diabetes (GODIN et al., 1988; WOHAIEB; GODIN,

1987). Após 15 semanas de indução do diabetes, não foi observada alteração da atividade da GPx (MAK et al., 1996).

Kakkar et al. (1995) afirmaram que o aumento da atividade da enzima GPx observada em rim de ratos diabéticos sacrificados 10 semanas após a indução do diabetes é uma resposta fisiológica à redução da atividade da enzima CAT, e que o aumento da atividade da enzima GPx é o resultado da presença de estresse oxidativo. Os autores afirmaram que altas concentrações de ânion superóxido reduzem a atividade das enzimas GPx e CAT.

A enzima GPx teve um aumento de cerca de 40% na sua atividade específica na glândula parótida, o que não ocorreu na glândula submandibular. Esse aumento na glândula parótida pode ser devido aos mesmos fatores que levaram ao aumento na atividade da enzima CAT, pois ambas atuam sobre o mesmo substrato, isto é, o peróxido de hidrogênio.

A GSH funciona como um substrato e cofator da GPx e sua falta pode reduzir a atividade dessa enzima (DOMINGUEZ et al., 1998).

Nas glândulas submandibulares observamos um aumento na concentração de GSH e de GSSG. Apesar disso, não houve aumento da atividade da enzima GPx, sugerindo que nesta glândula, apesar de ter aumentado a concentração de seu substrato e cofator, a não elevação da atividade da enzima está ligada à inibição causada por outro fator, provavelmente ao aumento da concentração de ânions superóxido.

Podemos ainda notar que há um aumento na relação GSH/GSSG na glândula submandibular, o que sugere uma maior produção deste tripeptídeo no estado diabético nessa glândula.

O aumento na concentração de ânions superóxido pode ser comprovado determinando a concentração de MDA, que é formado pela peroxidação lipídica causada por acúmulo de ânions superóxido. Na glândula submandibular, notamos um aumento de quase 80% do seu conteúdo. Essa observação mostra que provavelmente o acúmulo de ânions superóxido pode ser o responsável por não haver aumento na atividade da enzima CAT e GPx, apesar do aumento da concentração de GSH.

Na glândula parótida ocorre o inverso. Houve uma redução de cerca de 40% no conteúdo de GSH. Se notarmos que houve um aumento de cerca de 40% na atividade da enzima GPx, podemos sugerir que essa enzima está consumindo o seu substrato em maior velocidade. Tanto isso é verdade que a relação GSH/GSSG está diminuída no grupo diabético. Apesar de estar com seu sistema antioxidante ativado, esta glândula não sofreu dano oxidativo, medido pela peroxidação lipídica, sugerindo que a glândula parótida após 30 dias de indução do diabetes tem conseguido combater as EROs geradas no estado diabético.

O aumento na concentração de GSH em rim foi mostrado por Mak et al. (1996) que acompanhou o aumento na atividade da enzima GPx em ratos sacrificados 15 semanas após a indução do diabetes.

Em fígado de ratos foi mostrado um aumento no conteúdo de GSH (SAXENA et al., 1993; WOHAIEB; GODIN, 1987) e não foi observada diferença no conteúdo de GSSG (SAXENA et al., 1993). Nestes estudos, a atividade da enzima GPx esteve reduzida. Em pâncreas não houve alteração no conteúdo de GSH (WOHAIEB; GODIN, 1987).

O tratamento via oral com GSH aumentou a atividade da enzima SOD no fígado (LOVEN et al., 1986).

Essa maior capacidade de defesa da glândula parótida pode ser devido às características do seu metabolismo. Essa glândula apresenta um metabolismo predominantemente aeróbico. Como é justamente o metabolismo aeróbico a principal fonte de EROs no organismo, esta glândula está mais preparada ao combate dessas EROs que a glândula submandibular, cujo metabolismo predominante é o anaeróbico.

Após o período experimental, a determinação lipídica em sangue dos ratos mostrou aumento da concentração de MDA em eritrócitos, o que caracteriza a ocorrência do estresse oxidativo nesses animais.

Eritrócitos são especialmente susceptíveis ao dano oxidativo devido à alta concentração de ácidos graxos polinsaturados em sua membrana e à alta concentração de oxigênio e hemoglobina, cujo poder redutor do O_2 é conhecido na geração de radicais livres (AGUIRRE et al., 1998).

Esse aumento da concentração de MDA em animais diabéticos está de acordo com os achados de Qujeq, Aliakbarpour e Kalavi (2004), Kakkar et al. (1995), Dominguez et al. (1998) e Cay et al. (2001).

Os gráficos de correlação mostram resultados muito interessantes.

Na glândula submandibular o aumento da glicemia sanguínea foi diretamente proporcional ao aumento da peroxidação lipídica glandular e dos conteúdos de GSH e GSSG. Essas observações mostram que os danos lipídicos nessa glândula são diretamente ligados ao aumento da glicemia, e que a glândula submandibular tenta combater o estresse oxidativo aumentando a síntese de GSH, porém a atividade das enzimas não está respondendo a altura do estresse, causando o dano.

Na glândula parótida a atividade das enzimas CAT e GPx acompanhou o aumento da glicemia sanguínea, mostrando que há uma resposta ao estresse oxidativo por parte da glândula parótida, que impediu o desenvolvimento de dano lipídico no período experimental de 30 dias.

Dentre as enzimas do sistema antioxidante na glândula parótida, a SOD não mostrou alteração, enquanto a GPx e a CAT estão elevadas, sugerindo que na glândula parótida a GPx e a CAT são mais efetivas no combate as EROs do que a SOD, estando de acordo com Ilgazli et al. (2004), os quais sugerem que o sistema GSH é mais efetivo do que a enzima SOD no combate as EROs.

Após longos períodos de indução do diabetes, Kowluru e Abbas (2003) mostraram a ocorrência de apoptose celular causada provavelmente pela hiperglicemia crônica, tornando desta forma permanentes os danos celulares no diabetes.

7 CONCLUSÕES

A análise e discussão dos resultados obtidos no presente trabalho permitem-nos concluir que em ratos diabéticos sacrificados 30 dia após a indução:

- 7.1 Não há alteração na atividade da enzima SOD nas glândulas salivares.
- 7.2 Há um aumento nas atividades das enzimas CAT e GPx na glândula parótida, o que não ocorreu na glândula submandibular.
- 7.3 O conteúdo de GSH está aumentado na glândula submandibular e reduzido na glândula parótida.
- 7.4 O conteúdo de GSSG está aumentado na glândula submandibular. Na glândula parótida, não há alteração da concentração.
- 7.5 Existe um aumento da peroxidação lipídica na glândula submandibular, o que caracteriza o desenvolvimento de estresse oxidativo, o que não foi observado na glândula parótida.

REFERÊNCIAS¹

Adachi T, Ohta H, Hirano K, Hayashi K, Marklund SL. Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* 1991;279 (Pt 1):263-7.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.

Aguirre F, Martin I, Grinspon D, Ruiz M, Hager A, De Paoli T, et al. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity, and glucemic control in elderly NIDDM patients. *Free Radic Biol Med* 1998;24(4):580-5.

Alam SQ, Shi YY. The effect of essential fatty acid deficiency on the fatty acid composition of different salivary glands and saliva in rats. *Arch Oral Biol* 1997;42(10-11):727-34.

Anderson LC. Effects of alloxan diabetes and insulin in vivo on rat parotid gland. *Am J Physiol* 1983;245(3):G431-7.

Anderson LC, Bevan CA. Effects of streptozotocin diabetes on amylase release and cAMP accumulation in rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* 1992;37(5):331-6.

Anderson LC, Garrett JR. Lipid accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. *Arch Oral Biol* 1986;31(7):469-75.

Anderson LC, Johnson DA. Effect of alloxan diabetes on rat parotid gland and saliva. *Comp Biochem Physiol B* 1981;70B:725-30.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Anderson LC, Shapiro BL. The effect of alloxan diabetes and insulin in vivo on peroxidase activity in the rat submandibular gland. *Arch Oral Biol* 1979;24(5):343-5.

Avula CP, Fernandes G. Modulation of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in murine salivary gland by dietary fatty acid ethyl esters. *Life Sci* 1999;65(22):2373-83.

Banoczy J, Albrecht M, Rigo O, Ember G, Ritlop B. Salivary secretion rate, pH, lactobacilli and yeast counts in diabetic women. *Acta Diabetol Lat* 1987;24(3):223-8.

Barroso AS, Quissell DO, Colepicolo P. Modulation of SOD activity in rat submandibular glands. *Arch Oral Biol* 2003;48(2):133-9.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48(1):1-9.

Belce A, Uslu E, Kucur M, Umut M, Ipbuker A, Seymen HO. Evaluation of salivary sialic acid level and Cu-Zn superoxide dismutase activity in type 1 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med* 2000;192(3):219-25.

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49(2 Suppl 1):3-8.

Bhuyan KC, Bhuyan DK, Podos SM. Lipid peroxidation in cataract of the human. *Life Sci* 1986;38(16):1463-71.

Bray RC, Cockle SA, Fielden EM, Roberts PB, Rotilio G, Calabrese L. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J* 1974;139(1):43-8.

Cay M, Naziroglu M, Simsek H, Aydilek N, Aksakal M, Demirci M. Effects of intraperitoneally administered vitamin C on antioxidative defense mechanism in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Res Exp Med (Berl)* 2001;200(3):205-13.

Chavez EM, Taylor GW, Borrell LN, Ship JA. Salivary function and glycemic control in older persons with diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;89(3):305-11.

Cherry-Peppers G, Sorkin J, Andres R, Baum BJ, Ship JA. Salivary gland function and glucose metabolic status. *J Gerontol* 1992;47(4):M130-4.

Cho SY, Park JY, Park EM, Choi MS, Lee MK, Jeon SM, et al. Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clin Chim Acta* 2002;317(1-2):109-17.

Conner S, Iranpour B, Mills J. Alteration in parotid salivary flow in diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;30(1):55-9.

Dodds MW, Dodds AP. Effects of glycemic control on saliva flow rates and protein composition in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;83(4):465-70.

Dohi T, Kawamura K, Morita K, Okamoto H, Tsujimoto A. Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res* 1988;20(11):671-5.

Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998;21(10):1736-42.

Edgar WM. Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J* 1992;172(8):305-12.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-21.

Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 2003;35(3):236-56.

Feillet-Coudray C, Rock E, Coudray C, Grzelkowska K, Azais-Braesco V, Dardevet D, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 1999;284(1):31-43.

Floyd RA. The effect of peroxides and free radicals on body tissues. J Am Dent Assoc 1997;128 Suppl:37S-40S.

Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. J Am Soc Nephrol 2003;14:S254-8.

Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomed Pharmacother 1999;53(4):169-80.

Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. Mol Cell Biochem 1988;84(2):223-31.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radical in Biology and Medicine. 3rd ed. New York: Oxford Science Publications; 2003.

Harrison R, Bowen WH. Flow rate and organic constituents of whole saliva in insulin-dependent diabetic children and adolescents. Pediatr Dent 1987;9(4):287-91.

Horie S, Ishii H, Suga T. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. J Biochem 1981;90(6):1691-6.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent 2001;85(2):162-9.

Ilgazli A, Sengul C, Maral H, Ozden M, Ercin C. The effects of thinner inhalation on superoxide dismutase activities, malondialdehyde and glutathione levels in rat lungs. Clin Chim Acta 2004;343(1-2):141-4.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. Diabetes 2000;49(11):1939-45.

Ip SP, Poon MK, Che CT, Ng KH, Kong YC, Ko KM. Schisandrin B protects against carbon tetrachloride toxicity by enhancing the mitochondrial glutathione redox status in mouse liver. Free Radic Biol Med 1996;21(5):709-12.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 1990;268(1):69-71.

Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1995;151(2):113-9.

Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. *Life Sci* 1997;60(9):667-79.

Karasu C. Increased activity of H₂O₂ in aorta isolated from chronically streptozotocin-diabetic rats: effects of antioxidant enzymes and enzymes inhibitors. *Free Radic Biol Med* 1999;27(1-2):16-27.

Kennedy AL, Lyons TJ. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of diabetic complications. *Metabolism* 1997;46(12 Suppl 1):14-21.

Kim SK, Cuzzort LM, McKean RK, Allen ED. Effects of diabetes and insulin on alpha-amylase messenger RNA levels in rat parotid glands. *J Dent Res* 1990;69(8):1500-4.

Kjellman O. Secretion rate and buffering action of whole mixed saliva in subjects with insulin-treated diabetes mellitus. *Odontol Revy* 1970;21(2):159-68.

Kowluru RA, Abbas SN. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(12):5327-34.

Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 2000;47(3):457-64.

Lamey PJ, Fisher BM, Frier BM. The effects of diabetes and autonomic neuropathy on parotid salivary flow in man. *Diabet Med* 1986;3(6):537-40.

Li JM, Shah AM. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2002;277(22):19952-60.

Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2003;243(1-2):147-52.

Little JW. Recent advances in diabetes mellitus of interest to dentistry. *Spec Care Dentist* 2000;20(2):46-52.

Liu FT, Lin HS. Relationship between insulin and growth hormone in growth and development of rat submandibular gland. *Proc Soc Exp Biol Med* 1969a;131:175-6.

Liu FT, Lin HS. Role of insulin in body growth and the growth of salivary and endocrine glands in rats. *J Dent Res* 1969b;48(4):559-67.

Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Diekus M, et al. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 1986;35(5):503-7.

Lowry OH, Rosebrough NS, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.

Mak DH, Ip SP, Li PC, Poon MK, Ko KM. Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1996;162(2):153-8.

Manfredi M, McCullough MJ, Vescovi P, Al-Kaarawi ZM, Porter SR. Update on diabetes mellitus and related oral diseases. *Oral Dis* 2004;10(4):187-200.

Marder MZ, Abelson DC, Mandel ID. Salivary alterations in diabetes mellitus. *J Periodontol* 1975;46(9):567-9.

Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003;34(12):1563-74.

Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;4:D339-45.

Matteucci E, Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000;23(8):1182-6.

McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968;243(21):5753-60.

Meurman JH, Collin HL, Niskanen L, Toyry J, Alakuijala P, Keinanen S, et al. Saliva in non-insulin-dependent diabetic patients and control subjects: The role of the autonomic nervous system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;86(1):69-76.

Nagler RM, Klein I, Zarzhevsky N, Drigues N, Reznick AZ. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. *Free Radic Biol Med* 2002;32(3):268-77.

Nagler RM, Reznick AZ, Slavin S, Nagler A. Partial protection of rat parotid glands from irradiation-induced hyposalivation by manganese superoxide dismutase. *Arch Oral Biol* 2000;45(9):741-7.

Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in the major salivary glands of rats. *Arch Oral Biol* 1976;21(11):659-61.

Nogueira FN. Influência do estado diabético sobre a atividade e distribuição das enzimas HK e PFK-1 nas glândulas submandibular e parótida de ratos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2001.

Notkins AL. The causes of diabetes. *Sci Am* 1979;241(5):62-73.

Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988;5(2):113-24.

Oliveira HR, Curi R, Carpinelli AR. Glucose induces an acute increase of superoxide dismutase activity in incubated rat pancreatic islets. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 1):C507-10.

Oliveira HR, Verlengia R, Carvalho CR, Britto LR, Curi R, Carpinelli AR. Pancreatic beta-cells express phagocyte-like NAD(P)H oxidase. *Diabetes* 2003;52(6):1457-63.

Opara EC. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med* 2004;52(1):19-23.

Pithon-Curi TC, Levada AC, Lopes LR, Doi SQ, Curi R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. *Clin Sci* 2002;103(4):403-8.

Qujeq D, Aliakbarpour HR, Kalavi K. Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2004;340(1-2):79-83.

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.

Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol* 1993;45(3):539-42.

Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 2002;321(1-2):89-96.

Sharon A, Ben-Aryeh H, Itzhak B, Yoram K, Szargel R, Gutman D. Salivary composition in diabetic patients. *J Oral Med* 1985;40(1):23-6.

Streckfus CF, Marcus S, Welsh S, Brown RS, Cherry-Peppers G, Brown RH. Parotid function and composition of parotid saliva among elderly edentulous African-American diabetics. *J Oral Pathol Med* 1994;23(6):277-9.

Szczepanski A, Mednieks MI, Hand AR. Expression and distribution of parotid secretory proteins in experimental diabetes. *Eur J Morphol* 1998;36 Suppl:240-6.

Ten Cate AR. Oral histology: development, structure, and function. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1994.

Tenovuo J, Alanen P, Larjava H, Viikari J, Lehtonen OP. Oral health of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Dent Res* 1986a;94(4):338-46.

Tenovuo J, Lehtonen OP, Viikari J, Larjava H, Vilja P, Tuohimaa P. Immunoglobulins and innate antimicrobial factors in whole saliva of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Dent Res* 1986b;65(1):62-6.

Thorstensson H, Falk H, Hugoson A, Olsson J. Some salivary factors in insulin-dependent diabetics. *Acta Odontol Scand* 1989;47(3):175-83.

Torres MD, Canal JR, Perez C. Oxidative stress in normal and diabetic rats. *Physiol Res* 1999;48(3):203-8.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003;57(3-4):145-55.

Ugochukwu NH, Cobourne MK. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. *Clin Chim Acta* 2003;336(1-2):73-81.

Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 1981;77:325-33.

West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000;17(3):171-80.

Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987;36(9):1014-8.

Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245(1):243-50.

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

COLAR A CÓPIA DO PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

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

Nogueira, Fernando Neves

Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos / Fernando Neves Nogueira; orientador José Nicolau. -- São Paulo, 2004.

72p. : tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Materiais dentários) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Glândula submandibular – Diabetes Mellitus 2. Glândula parótida – Diabetes Mellitus

CDD 617.695
BLACK D132

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 E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail: fnn@usp.br