

**MARLUS DA SILVA PEDROSA**

**Efeito do diabetes na presença ou ausência da insulina na produção e atividade  
de enzimas chave do metabolismo energético em  
glândulas submandibulares de ratos**

São Paulo

2022



**MARLUS DA SILVA PEDROSA**

**Efeito do diabetes na presença ou ausência da insulina na produção e atividade  
de enzimas chave do metabolismo energético em  
glândulas submandibulares de ratos**

**Versão Corrigida**

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

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira

São Paulo

2022

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

---

Pedrosa, Marlus da Silva.

Efeito do diabete na presença ou ausência da insulina na produção e atividade de enzimas chave do metabolismo energético em glândulas submandibulares de ratos / Marlus da Silva Pedrosa; orientador Fernando Neves Nogueira -- São Paulo, 2022.

111 p. : fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.  
Versão corrigida.

1. Diabetes Mellitus. 2. Metabolismo. 3. Glicólise. 4. Ciclo de Krebs. 5. Glândulas salivares. I. Nogueira, Fernando Neves. II. Título.

Pedrosa MS. Efeito do diabete na presença ou ausência da insulina na produção e atividade de enzimas chave do metabolismo energético em glândulas submandibulares de ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 04 / 02 / 2022

### **Banca Examinadora**

Prof(a). Dr. Jose Nicolau

Instituição: FO-USP

Julgamento: Aprovado

Profa. Alyne Simoes Gonçalves

Instituição: FO-USP

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Cassia Marta de Toledo Bergamaschi

Instituição: UNIFESP - Externo

Julgamento: Aprovado



*Dedico este trabalho à Ana Maria Cruz da Silva, minha mãe e a pessoa mais importante da minha vida, que sabendo de minha vontade e pretensão em querer ir além, acreditando em cada conjectura de sonho, simplesmente me catapultou, alicerçando o caminho que escolhi seguir.*





## AGRADECIMENTOS

À **Deus** que mesmo diante do cambalear de minha fé, me proporcionou momentos em que senti Sua presença me segurando no colo, por vezes me amparando e dando forças, sempre alicerçando e iluminando novos caminhos.

Ao **Prof. Dr. Igor Studart Medeiros** por ter respondido aquele e-mail de um desconhecido pretendendo fazer Doutorado Direto. Sobretudo por ter acreditado e aceitado me guiar no início deste processo. Ainda, pelas portas abertas e pela amizade. Serei para sempre grato.

Ao **Douglas Nesadal de Souza** que sempre atencioso, foi com quem tive as primeiras lições no laboratório de Bioquímica Oral. Sempre paciente e solícito, alguém indispensável na conclusão deste trabalho de pesquisa. Considero também que foi um dos melhores amigos que tive neste processo.

Ao **Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira** pela orientação neste trabalho de pesquisa e por me permitir compreender um pouco o universo bioquímico das glândulas salivares.

Ao **Prof. Dr. José Nicolau**. Apesar da pouca convivência, alguém que me inspira pela vivacidade e amor à ciência.

À **Profa. Dra. Alyne Simões**. Uma pessoa do bem e de coração acolhedor, sempre disposta a ouvir e ajudar. Agradeço ainda pela amizade, carinho e oportunidades.

À **Profa. Dra. Carla Sipert** por ter me proporcionado aprender novas metodologias e possibilidades de pesquisa com células-tronco dentárias e materiais endodônticos. Ainda, pelos momentos de descontração e valiosa contribuição nas análises de expressão gênica desta tese.

Ao **Dr. Thiago José Dionísio**, técnico responsável Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), cuja ajuda foi essencial para a realização dos ensaios de expressão gênica desta tese.

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** por ter aberto as portas do Laboratório de Farmacologia da FOB-USP para a realização dos ensaios de expressão gênica.

Aos demais professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral (**Carlos Franci, Josete Meira, Paulo César, Paulo Capel, Rafael Ballester, Roberto Braga e Victor Arana**), pelos ensinamentos e pela convivência saudável e harmônica durante os anos dedicados a este doutorado.

Aos funcionários **Antônio, Elis, Eli e Rosinha** por serem sempre solícitos e cordiais.

À **Dona Fran**, uma pessoa de bom coração que sempre me tratou com muita gentileza. Às vezes, como um filho.

Aos colegas que fiz durante essa caminhada e dividiram comigo um objetivo comum: **Cláudia Meneses, Laura Nardello, Marina Chiari, Natália Bueno, Tomaz Alves, Vitor Baldo, Handy, Leticia Martins e Leticia Morgado**. Grato a vocês por terem tornado meus dias mais leves e felizes.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de doutorado direto (cota institucional) nos primeiros anos do curso.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro (Auxílio 19/14556-7) e bolsa de doutorado direto (Processo 2020/07903-0).

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá.*

*De alguma maneira você chega lá”*

(Ayrton Senna, 1994)



## RESUMO

Pedrosa MS. Efeito do diabete na presença ou ausência da insulina na produção e atividade de enzimas chave do metabolismo energético em glândulas submandibulares de ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito do diabete (DM) na presença ou ausência da insulina na expressão, quantidade e atividade de enzimas chaves do metabolismo glicolítico, do glicogênio, do ciclo de Krebs e do metabolismo de lipídeos nas glândulas submandibulares (SM) de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Vinte e quatro ratos Wistar machos foram divididos em três grupos (n = 8 em cada): controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (10 U / kg) (D + I). Nas glândulas SM, os níveis de mRNA e a atividade das enzimas hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase 1 (PFK-1), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), piruvato desidrogenase (PDH), acetil-CoA sintase (ACS), citrato sintase (CS), succinil-CoA sintase (SUCLA), alfa-cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ -KGDH), succinato desidrogenase (SDH), carinitina palmitoil transferase 1 (CPT-1), acetil-CoA carboxilase (ACC), ATP-citrato liase (ACLY), acetil-CoA desidrogenase (ACAD), glicogênio sintase (GS) e glicogênio fosforilase (GF) foram analisados. A quantificação total das enzimas foi determinada nos casos de discrepância entre a expressão gênica e a atividade enzimática. Os resultados evidenciaram que o estado hiperglicêmico no diabetes alterou a expressão e atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético das glândulas SM levando a nova síntese de ácidos graxos e consumo de glicogênio e acetato. A administração de insulina aumentou a via da pentose fosfato e a degradação e síntese lipídica na glândula SM. Em conjunto, os dados sugerem que as alterações metabólicas presentes na glândula SM no DM são principalmente insulino-dependentes e reversíveis.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Metabolismo. Glicólise. Ciclo De Krebs. Glândulas Salivares.



## ABSTRACT

Pedrosa MS. Effect of diabetes on the presence or absence of insulin in the production and activity of key enzymes of energy metabolism in rat submandibular glands [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

The aim of this study was to verify the effect of diabetes in the presence or absence of insulin on the expression, quantity and activity of key enzymes of glycolytic metabolism, glycogen, Krebs cycle and lipid metabolism in the submandibular (SM) glands of diabetic rats induced by streptozotocin. Twenty-four male Wistar rats were divided into three groups (n = 8 in each): control (C), diabetic (D), and diabetic treated with insulin (10 U/kg) (D+I). In the SM glands, the mRNA levels and activity of hexokinase (HK), phosphofruktokinase 1 (PFK-1), pyruvate kinase (PK), lactate dehydrogenase (LDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), pyruvate dehydrogenase (PDH), acetyl-CoA synthase (ACS), citrate synthase (CS), succinil-CoA sintetase (SUCLA), alpha-ketoglutarate dehydrogenase ( $\alpha$ -KGDH), succinate dehydrogenase (SDH), carinitine palmitoil transferase 1 (CPT-1), acetil-CoA carboxilase (ACC), atp-citrate liase (ACLY), acetyl-CoA dehydrogenase (ACAD), glycogen synthase (GS), and glycogen phosphorylase (GP) were analyzed. The quantification of enzymes was determined in cases of discrepancy between gene expression and enzymatic activity. The results showed that the hyperglycemic state in diabetes altered the expression and activity of enzymes involved in the energetic metabolism of the SM glands leading to novo fatty-acid synthesis and consumption of glycogen and acetate. The insulin administration increased the pentose phosphate pathway and lipid synthesis and degradation in the SM gland. Altogether, the data suggest that metabolic alterations present in the SM gland in DM are mainly insulin-dependent and reversible.

Keywords: Diabetes Mellitus. Metabolism. Glycolysis. Krebs' Cycle. Salivary Glands.





## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 -	Esquema metabólico das enzimas alvo do estudo .....	37
Figura 4.1 -	Fluxograma experimental.....	40
Quadro 4.1 -	Genes analisados .....	44
Figura 5.1 -	Valores de glicemia 72 h do início do tratamento com insulina aferidos antes (8:00 AM) e após 12 h (8:00 PM) da administração .....	55
Figura 5.2 -	Valores de glicemia antes e após o tratamento com insulina .....	56
Figura 5.3 -	Massa dos animais (em gramas) .....	57
Figura 5.4 -	Consumo de ração (g / kg de massa corporal) .....	58
Figura 5.5 -	Consumo de água (mL / kg de massa corporal) .....	59
Figura 5.6 -	Quantificação de insulina .....	60
Figura 5.7 -	Proteína total nas glândulas salivares submandibulares .....	61
Figura 5.8 -	Quantificação relativa de mRNA da hexoquinase 1 .....	62
Figura 5.9 -	Expressão relativa de mRNA da hexoquinase 2.....	63
Figura 5.10 -	Expressão relativa de mRNA da hexoquinase 3.....	63
Figura 5.11 -	Atividade enzimática da hexoquinase .....	64
Figura 5.12 -	Expressão relativa de mRNA da fosfofrutoquinase 1 (plaqueta) .....	65
Figura 5.13 -	Expressão relativa de mRNA da fosfofrutoquinase 1 (músculo) .....	65
Figura 5.14 -	Atividade enzimática de fosfofrutoquinase-1.....	66
Figura 5.15 -	Expressão relativa de mRNA da piruvato quinase (músculo) .....	66
Figura 5.16	Expressão relativa de mRNA da piruvato quinase (fígado e células vermelhas do sangue) .....	67
Figura 5.17 -	Atividade enzimática de piruvato quinase .....	68
Figura 5.18 -	Expressão relativa de mRNA de lactato desidrogenase .....	68

Figura 5.19 - Atividade enzimática de lactato desidrogenase.....	69
Figura 5.20 - Quantificação total da enzima lactato desidrogenase.....	69
Figura 5.21 - Expressão relativa de mRNA de glicogênio sintase 1 .....	70
Figura 5.22 - Expressão relativa de mRNA de glicogênio sintase 2 .....	71
Figura 5.23 - Atividade enzimática de glicogênio sintase .....	71
Figura 5.24 - Expressão relativa de mRNA de glicogênio fosforilase (fígado) .....	72
Figura 5.25 - Expressão relativa de mRNA de glicogênio fosforilase (músculo) ....	73
Figura 5.26 - Atividade enzimática de glicogênio fosforilase .....	73
Figura 5.27 - Quantidade total da enzima glicogênio fosforilase .....	74
Figura 5.28 - Expressão relativa de mRNA de glicose-6-fosfato desidrogenase ....	75
Figura 5.29 - Atividade enzimática de glicose-6-fosfato desidrogenase .....	75
Figura 5.30 - Atividade enzimática de piruvato desidrogenase.....	76
Figura 5.31 - Expressão relativa de mRNA de acetil-CoA sintase.....	77
Figura 5.32 - Atividade enzimática de Acetil-CoA sintase.....	77
Figura 5.33 - Expressão relativa de mRNA de citrato sintase.....	78
Figura 5.34 - Atividade enzimática de citrato sintase.....	79
Figura 5.35 - Expressão relativa de mRNA de alfa-cetoglutarato desidrogenase.....	79
Figura 5.36 - Atividade enzimática de $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase .....	80
Figura 5.37 - Quantidade total da enzima alfa-cetoglutarato desidrogenase.....	81
Figura 5.38 - Expressão relativa de mRNA de succinato desidrogenase .....	81
Figura 5.39 - Atividade enzimática de succinato desidrogenase .....	82
Figura 5.40 - Expressão relativa de mRNA de carnitina palmitoil transferase 1A.....	83
Figura 5.41 - Expressão relativa de mRNA de carnitina palmitoil transferase 1B.....	83
Figura 5.42 - Atividade enzimática da Carnitina Palmitoil Transferase 1 .....	84

Figura 5.43 - Expressão relativa de mRNA da ATP-citrato Liase.....	85
Figura 5.44 - Atividade enzimática da ATP-citrato Liase .....	85
Figura 5.45 - Expressão relativa de mRNA de Acetil-CoA Carboxilase Beta .....	86
Figura 5.46 - Atividade enzimática de Acetil-CoA carboxilase .....	87
Figura 5.47 - Expressão relativa de mRNA de Acil-CoA Desidrogenase .....	87
Figura 5.48 - Atividade enzimática de Acetil-CoA desidrogenase .....	88
Figura 5.49 - Mapa de calor que representa os resultados gerais da expressão gênica de enzimas dos alvos do metabolismo energético nas glândulas salivares submandibulares dos animais controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com insulina (D + I) .....	89
Figura 5.50 - Representação esquemática das vias metabólicas estudadas nos animais diabéticos comparados com controle.....	90
Figura 5.51 - Representação esquemática das vias metabólicas estudadas nos animais diabéticos tratados com insulina em relação aos diabéticos não tratados .....	91



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -KGDH	$\alpha$ -cetogluturato desidrogenase
$\epsilon$	Coeficiente de extinção molar
x g	Força centrífuga relativa
$\mu$ g	Micrograma
$^{13}\text{C}$	Isótopos de carbono 13
Acacb	Gene da enzima acetil-CoA carboxilase beta
ACAD	Acetil-CoA desidrogenase
Acads	Gene da enzima acil-CoA desidrogenase
ACC	Acetil-CoA carboxilase
Acly	Gene da enzima ATP-citrato liase
ACLY	ATP-citrato liase
ACS	Acetil-CoA sintase
Acss1	Gene da enzima acil-CoA sintetase de cadeia curta 1
Actb	Gene para beta actina
AMP	Monofosfato de adenosina
AQP-5	Aquaporina 5
ATP	Adenosina trifosfato
ATP	Adenosina trifosfato
C	Grupo controle
$\text{Ca}^{+2}$	Cálcio
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
cDNA	DNA complementar
CoA	Coenzima A
CPT1	Carinitina palmitoil transferase 1
CPT1a	Gene da enzima carinitina palmitoiltransferase 1
Cs	Gene da enzima citrato sintase
CS	Citrato sintase
CT	cicle threshold ou ciclo limiar
Ct	Limiar do ciclo
D	Grupo diabético
D + I	Grupo diabético tratado com insulina

DAG	Diacilglicerol
DCIP	Diclorofenol Indofenol
DM	Diabetes mellitus
DNase I	Desoxirribonuclease I
DNFH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAM	6-carboxifluoresceína
g	grama
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
G6pd	Gene da enzima glicose 6 fosfato desidrogenase
GF	Glicogênio fosforilase
GS	Glicogênio sintase
GSH	Glutathiona reduzida
GTP	Trifosfato de guanosina
Gys1	Gene da enzima glicogênio sintase 1
Gys2	Gene da enzima glicogênio sintase 2
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxido de hidrogênio
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
HK	Hexoquinase
Hk1	Gene da enzima hexoquinase 1
Hk2	Gene da enzima hexoquinase 2
HK3	Gene da enzima hexoquinase 3
IP3	Inositol trifosfato
K <sup>+</sup>	Potássio
k <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
KCL	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio monobásico
KU	Unidade de kilo
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
Ldha	Gene da enzima lactato desidrogenase A
M	molar

mg	miligrama
MGB	Minor groove binder
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> 2Cl <sup>-</sup>	Cotransportador de sódio / potássio / cloreto
Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase	Bomba sódio-potássio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NAD	Dinucleotide de adenina de nicotinamida
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NaF	Fluoreto de sódio
nm	Nanometros
OGDH	Quantidade total da enzima α-cetoglutarato desidrogenase
Ogdh	Gene da enzima α-cetoglutarato desidrogenase
PA	Parótida
PDH	Piruvato desidrogenase
Pdhx	Gene da enzima piruvato desidrogenase X
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK-1	Fosfofrutoquinase 1
Pfkm	Gene da enzima fosfofrutoquinase I, músculo
Pfkp	Gene da enzima fosfofrutoquinase I, plaqueta
pH	Potencial hidrogeniônico
PIP2	Fosfatidil-inositol-bifosfato
PK	Piruvato quinase
PK-A	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
Pklr	Gene da enzima piruvato quinase, fígado e células vermelhas do sangue

Pkm	Gene da enzima piruvato quinase, músculo
Pygm	Gene da enzima glicogênio fosforilase, músculo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
Sdh	Gene da enzima succinato desidrogenase
SDH	Succinato desidrogenase
SM	Submandibular
STZ	Estreptozotocina
SUCLA	Succinil-CoA sintetase
Sucla2	Gene da enzima succinil-CoA sintetase
TCA	Ácido tricloroacético
TEA	Trietanolamina
TIM	Triose-fosfato isomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochlorid
U	unidade de atividade enzimática
UDP	Difosfato de uridina glicose
uM	micromolar



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	29
2.1	GLÂNDULAS SALIVARES .....	29
2.2	METABOLISMO ENERGÉTICO NAS GLÂNDULAS SALIVARES.....	31
2.3	DIABETE .....	32
2.4	ALTERAÇÕES SALIVARES E GLANDULARES NO DIABETE .....	33
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	35
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS .....	39
4.2	ANIMAIS.....	39
4.3	INDUÇÃO DO DIABETE .....	40
4.4	ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA .....	40
4.5	PERÍODO EXPERIMENTAL .....	41
4.6	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	41
<b>4.6.1</b>	<b>Glândula Salivar</b> .....	41
<b>4.6.2</b>	<b>Sangue</b> .....	41
4.7	ANÁLISES .....	42
<b>4.7.1</b>	<b>Determinação de Glicemia</b> .....	42
<b>4.7.2</b>	<b>Determinação de Insulina</b> .....	42
<b>4.7.3</b>	<b>Expressão Gênica</b> .....	42
4.7.3.1	Extração de RNA .....	42
4.7.3.2	Transcrição Reversa .....	43
4.7.3.3	PCR Quantitativo em Tempo Real .....	43
<b>4.7.4</b>	<b>Determinação de Proteína Total</b> .....	44
<b>4.7.5</b>	<b>Atividades Enzimáticas</b> .....	45
4.7.5.1	Hexoquinase .....	45
4.7.5.2	Fosfofrutoquinase.....	45
4.7.5.3	Piruvato Quinase .....	46
4.7.5.4	Lactado Desidrogenase.....	46
4.7.5.5	Glicose-6-fosfato Desidrogenase .....	47

4.7.5.6	Piruvato Desidrogenase.....	47
4.7.5.7	Acetil-CoA Sintase.....	48
4.7.5.8	Citrato Sintase.....	48
4.7.5.9	Succinil-CoA Sintetase.....	49
4.7.5.10	Alfa-Cetoglutarato Desidrogenase.....	49
4.7.5.11	Succinato Desidrogenase.....	49
4.7.5.12	Carinitina Palmitoil Transferase 1.....	50
4.7.5.13	Acetil-CoA Carboxilase.....	50
4.7.5.14	ATP-citrato Liase.....	51
4.7.5.15	Acetil-CoA Desidrogenase.....	51
4.7.5.16	Glicogênio Sintase.....	52
4.7.5.17	Glicogênio Fosforilase.....	52
<b>4.7.6</b>	<b>Determinação da Quantidade Total de Enzimas.....</b>	<b>53</b>
<b>4.7.7</b>	<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1	DADOS DOS ANIMAIS.....	55
5.1.1	<b>Glicemia.....</b>	<b>55</b>
5.1.2	<b>Massa Corporal.....</b>	<b>57</b>
5.1.3	<b>Consumo de Ração.....</b>	<b>58</b>
5.1.4	<b>Consumo de Água.....</b>	<b>59</b>
5.1.5	<b>Insulina.....</b>	<b>60</b>
5.2	PROTEÍNA TOTAL.....	61
5.3	EXPRESSÃO GÊNICA, QUANTIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA... 61	
5.3.1	<b>Hexoquinase.....</b>	<b>62</b>
5.3.2	<b>Fosfofrutoquinase.....</b>	<b>64</b>
5.3.3	<b>Piruvato Quinase.....</b>	<b>66</b>
5.3.4	<b>Lactado Desidrogenase.....</b>	<b>68</b>
5.3.5	<b>Glicogênio Sintase.....</b>	<b>70</b>
5.3.6	<b>Glicogênio Fosforilase.....</b>	<b>72</b>
5.3.7	<b>Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....</b>	<b>75</b>
5.3.8	<b>Piruvato Desidrogenase.....</b>	<b>76</b>
5.3.9	<b>Acetil-CoA Sintase.....</b>	<b>77</b>
5.3.10	<b>Citrato Sintase.....</b>	<b>78</b>

<b>5.3.11</b>	<b>Alfa-Cetoglutarato Desidrogenase.....</b>	<b>79</b>
<b>5.3.12</b>	<b>Succinato Desidrogenase.....</b>	<b>81</b>
<b>5.3.13</b>	<b>Carinitina Palmitoil Transferase 1.....</b>	<b>82</b>
<b>5.3.14</b>	<b>ATP-citrato Liase.....</b>	<b>85</b>
5.3.14.1	Acetil-CoA Carboxilase.....	86
<b>5.3.15</b>	<b>Acetil-CoA Desidrogenase.....</b>	<b>87</b>
<b>5.4</b>	<b>REPRESENTAÇÃO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Expressão Gênica.....</b>	<b>88</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Atividade enzimática.....</b>	<b>90</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>101</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>111</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) representa um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou de ambos (Schuster; Duvuuri, 2002). A hiperglicemia no DM está associada a danos a longo prazo disfunção e falência de vários órgãos (Schuster; Duvuuri, 2002) incluindo as glândulas salivares (Matczuk et al., 2016). As glândulas submandibulares (SM), um dos três pares de glândulas salivares maiores, produzem a maior parte da saliva em repouso (Edgar et al., 2004; Tucker; Miletich, 2010; Edgar et al., 2012).

Estudos sobre o metabolismo das glândulas salivares estão associados à regulação da sua secreção (Deutsch; Raper, 1936; Stromblad, 1957; Terroux et al., 1959; Nicolau; Sasaki, 1976; Pedroso et al., 1976). A importância da via glicolítica e do glicogênio para a homeostase glandular já foi demonstrada na literatura científica (Anrep; Cannan, 1922a,b, 1923; English, 1955; Goldman et al., 1964; Masi et al., 1966; Nicolau; Sasaki, 1976; Pedroso et al., 1976; Nicolau et al., 2003; Nicolau et al., 2005; Nogueira; Carvalho, 2017). Entretanto, embora o significado clínico das glândulas salivares seja bem conhecido, as vias metabólicas que contribuem para sua função ainda precisam ser elucidadas. Esta informação poderia ser usada para direcionar o tratamento de distúrbios que envolvem as glândulas salivares tanto no DM como em outras doenças.

Estudos anteriores foram limitados a avaliar a atividade de enzimas da via glicolítica, da via das pentoses-fosfato e do metabolismo do glicogênio (Nicolau; Sasaki, 1976; Pedroso et al., 1976; Nicolau; Sasaki, 1983; Nicolau et al., 2003; Nogueira; Nicolau, 2004; Nicolau et al., 2005; Nogueira et al., 2005b; Nicolau et al., 2006). Uma característica fascinante dos estudos com enzimas é a regulação de sua atividade por pH, cofatores ou hormônios, como insulina.

A insulina tem sido reconhecida como mediadora de vários eventos fisiológicos nas glândulas salivares. Estudos mostram que receptores de insulina são expressos nas glândulas salivares, e que a insulina pode induzir e ativar elementos envolvidos nas etapas iniciais da sinalização da insulina em tecidos glandulares (Rocha et al., 2000). Nas glândulas salivares, a transferência de glicose para as células é mediada pelas proteínas GLUT-1, GLUT-2, GLUT 4 e SGLT-1. A expressão de mRNA dessas proteínas tem sido relatada tanto nas glândulas salivares submandibulares quanto nas parótidas (Jurysta et al., 2012; Jurysta et al., 2013; Cetik et al., 2014; Souza et al. 2016).

Quando os genes são expressos, eles fornecem informações úteis sobre sua função. Entretanto, o aumento da expressão de uma enzima não se correlaciona necessariamente com o aumento de sua atividade. Neste caso, é importante confirmar se as alterações na expressão correspondem a alterações na atividade enzimática. Neste estudo, buscamos avaliar em ratos o efeito do diabetes induzido por estreptozotocina na presença ou ausência de insulina na produção e atividade de enzimas-chave do metabolismo energético em glândulas submandibulares de ratos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são órgãos que produzem e secretam saliva, um fluido aquoso que desempenha importantes funções fisiológicas na cavidade oral. Estas glândulas podem ser classificadas como maiores e menores. As glândulas salivares maiores estão localizadas à maior distância da mucosa e seu produto chega à cavidade bucal através de ductos. As glândulas salivares menores estão localizadas no interior da mucosa bucal e vertem seus produtos diretamente na boca (Tucker; Miletich, 2010).

Em humanos, as glândulas parótida (PA), submandibular (SM) e sublingual (SL) compõem os três pares de glândulas salivares maiores. Juntas, elas são responsáveis pela produção de aproximadamente 90% do total da saliva produzida. Os 10% restantes são produto das glândulas salivares menores (Edgar et al., 2004). Em repouso, as glândulas SM são responsáveis por cerca de 60% do total de saliva produzida, enquanto as glândulas PA contribuem com cerca de 35% deste total. Durante a estimulação, a contribuição relativa das glândulas PA aumenta para 50%, enquanto a das glândulas SM cai para 35%. No entanto, devido a grandes mudanças no volume total de saliva produzida, 0,3 mL/min em repouso contra 1,0 mL/min estimulada, a atividade global de ambas as glândulas aumenta consideravelmente (2,5x na SM e 3,5x na PA). As glândulas salivares menores e a SL contribuem com os percentuais restantes (Edgar et al., 2012).

O processo secretório é bem conhecido e está relacionado ao estímulo do sistema nervoso simpático e parassimpático. Ambas vias promovem a secreção salivar, porém com características diferentes. De maneira geral o estímulo simpático leva a produção/secreção de uma saliva viscosa rica em proteínas, enquanto o estímulo parassimpático leva à produção/secreção de uma saliva aquosa rica em água e eletrólitos (Tucker; Miletich, 2010).

Os mecanismos regulatórios para as diferentes vias também são conhecidos. A transdução de sinal a partir do estímulo simpático se dá quando o receptor  $\beta$ -adrenérgico é ativado com a ligação a uma proteína de membrana (proteína G), havendo a exposição de sua subunidade  $\alpha$  que ativa a enzima adenilato ciclase, gerando 1 molécula de cAMP a partir do ATP. O cAMP, livre no citosol, liga-se à Proteína Quinase A (PK-A). A PK-A é formada por 2 subunidades: uma catalítica e outra regulatória. O cAMP liga-se à subunidade regulatória liberando a porção catalítica. Esta, por sua vez, fosforilará as proteínas alvo, promovendo a exocitose. Quando o estímulo é parassimpático, após a ligação ao receptor muscarínico, a proteína G também é clivada nas mesmas subunidades. A subunidade  $\alpha$  da proteína G também pode se ligar a outra proteína de membrana chamada Fosfolipase C. Esta promoverá a quebra do Fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub>, agora livre no citosol, permite a abertura de canais de Ca<sup>2+</sup> do retículo endoplasmático rugoso, promovendo o aumento da concentração plasmática de Ca<sup>2+</sup>. Este íon liga-se a calmodulina (uma proteína ligadora de Ca<sup>2+</sup>). O DAG, que permaneceu na membrana, ativa outra proteína de membrana, a proteína quinase C (PKC), que, ligada ao complexo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina, promoverá a fosforilação de proteínas específicas do citosol e da membrana, e também sua exocitose (Vatta et al., 2002; Proctor; Carpenter, 2007). Desta maneira, são considerados como principais segundos mensageiros o cAMP na via simpática, e o Ca<sup>2+</sup> na via parassimpática (Nicolau, 2009).

A secreção de água e eletrólitos pelas glândulas salivares é dependente diretamente do aumento da concentração intracelular de Ca<sup>2+</sup>. Três mecanismos são conhecidos. O principal é decorrente da abertura de canais de Cl<sup>-</sup> na membrana da célula acinar. Basicamente, este processo leva a um aumento de sua concentração na região luminal, criando um potencial negativo. Íons Na<sup>+</sup> chegam a esta região através da passagem pelo espaço intercelular, criando um gradiente osmótico que culmina na passagem de água também pelo espaço intercelular (Melvin et al., 2005). Este processo é dependente de alguns transportadores como Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> (cotransportador), canal de K<sup>+</sup> ativado por Ca<sup>2+</sup> e canal de Cl<sup>-</sup> ativado por Ca<sup>2+</sup>. Neste momento, há uma saliva isotônica em relação ao plasma no lúmen conhecida como saliva primária. Conforme a saliva flui pelos ductos, ocorre uma reabsorção dos íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> e a secreção de íons K<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pelas células



estriadas, alterando a concentração destes na saliva que chega à cavidade oral, tornando-a hipotônica (em relação ao  $\text{Na}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$ ) (Nicolau, 2009). O transporte de água também ocorre graças a proteínas de membrana conhecidas como aquaporinas. A presença da aquaporina 5 (AQP-5) na membrana apical de células acinares e sua importância na secreção de água para a saliva já foi demonstrada (Edgar et al., 2004; Delporte; Steinfeld, 2006). Sendo assim, qualquer alteração em uma das fases dos processos pode levar a uma redução na secreção de saliva pelas glândulas salivares.

## 2.2 METABOLISMO ENERGÉTICO NAS GLÂNDULAS SALIVARES

O funcionamento de células, tecidos e órgãos é dependente de energia. O processo pelo qual as células obtêm energia consiste em uma série de reações integradas chamadas de metabolismo, sendo a glicose e lipídeo os principais substratos destas reações.

Estudos do metabolismo glandular foram associados regulação da secreção glandular, sendo, no passado, associados ao consumo de glicose e oxigênio pelas glândulas (Deutsch; Raper, 1936; Stromblad, 1957; Terroux et al., 1959; Nicolau; Sasaki, 1976; Pedroso et al., 1976). Alguns destes já haviam demonstrado a importância da via glicolítica e do glicogênio para a homeostase glandular (Anrep; Cannan, 1922a,b, 1923; English, 1955; Goldman et al., 1964; Masi et al., 1966; Nicolau; Sasaki, 1976; Pedroso et al., 1976; Nicolau et al., 2005; Nogueira et al., 2005b).

Em um estudo em ratos (Nogueira; Carvalho, 2017), utilizando isótopos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e análise por ressonância magnética, foi possível analisar com mais profundidade o metabolismo glicolítico catabólico nas glândulas salivares. Em um estudo (Nogueira; Carvalho, 2017) foi demonstrado que durante o repouso, a principal via metabólica atuante da SM é a glicólise anaeróbia, enquanto na PA ocorre uma maior atividade do ciclo de Krebs. No estímulo secretório, ocorre o aumento tanto da glicólise quanto do ciclo de Krebs nas duas glândulas. Contudo, uma importante característica encontrada na SM foi a de não ser observado uma

rotação completa do substrato marcado no ciclo de Krebs. Isso demonstra a importância desta via para o metabolismo anabólico e não catabólico. Ou seja, na glândula SM o ciclo de Krebs tem grande importância para a síntese de aminoácidos que serão utilizados na síntese de proteínas.

Uma outra importante fonte de energia para o organismo é o metabolismo de lipídeos. Entretanto, os estudos envolvendo o metabolismo de lipídeos em glândulas salivares de ratos foram restritos à verificação da capacidade de suas mitocôndrias em utilizar ácidos graxos de cadeia longa (Horak; Pritchard, 1971), sintetizar triacilgliceróis, colesterol, fosfolipídios e sulfolipídios (Pritchard, 1967) e verificar a disponibilidade de oxaloacetato mitocondrial (Anderson; Garrett, 1986).

Uma intrigante diluição da marcação do substrato foi observada em um estudo prévio (Nogueira; Carvalho, 2017). Quando fornecido glicose uniformemente marcada para o metabolismo glandular ( $U^{13}C$ ), seria esperada uma relação proporcional entre a glicose fornecida e a concentração de piruvato e glutamato marcados (decorrente da conversão do  $\alpha$ -cetogluturato no ciclo de Krebs). Entretanto, foi observado uma considerada redução desta relação, o que demonstra que a glândula utilizou substratos metabólicos não marcados (diferentes da glicose), gerando piruvato e glutamato não marcados. Estas fontes podem ser o glicogênio (o que de fato utiliza, conforme já demonstrado anteriormente), quanto lipídeos, que são convertidos em Acetil-CoA e entram no ciclo de Krebs. Contudo, não é do nosso conhecimento o estudo das vias anabólicas e catabólicas de lipídeos nas glândulas salivares.

## 2.3 DIABETE

O DM é uma doença caracterizada pela hiperglicemia crônica dos seus doentes. Tem como causa a ausência do hormônio insulina ou da sua ação. Acomete jovens e adultos e possui basicamente 2 tipos. O tipo 1 tem, que tem como característica a ausência na produção de insulina e atinge principalmente jovens. O tipo 2 acomete principalmente adultos e está ligada diretamente à obesidade, na qual ocorre uma dessensibilização dos receptores de insulina das células. Os

principais sintomas apresentados pelos pacientes diabéticos são poliúria, polidipsia e polifagia.

#### 2.4 ALTERAÇÕES SALIVARES E GLANDULARES NO DIABETE

Em odontologia, alguns estudos mostram que pacientes diabéticos descompensados reportam xerostomia e/ou apresentam hipossalivação, com aumento nos índices de cárie e doença periodontal, principalmente (Cutando et al., 2003; Manfredi et al., 2004; Mata et al., 2004; Dodds et al., 2005; Teeuw et al., 2010; Al-Rawi, 2011).

Diversos estudos com modelos diabéticos têm demonstrado o estresse oxidativo como uma das principais causas de alterações decorrentes do estado hiperglicêmico (Forbes et al., 2003; Maritim et al., 2003; Rolo; Palmeira, 2006; Al-Rawi, 2011). A avaliação do sistema antioxidante e a presença de estresse oxidativo já foram analisadas em outros estudos, sendo demonstrado que 30 dias após a indução do diabetes há o dano causado por espécies reativas de oxigênio, principalmente nas glândulas submandibulares (Nicolau; Sasaki, 1976; Nogueira et al., 2005a; Ibuki et al., 2010). Foi evidenciado também que o sistema antioxidante da glândula parótida se mostra mais eficiente e não comprometido na doença quando comparado ao da glândula submandibular (Nicolau; Sasaki, 1976; Nogueira et al., 2005a; Ibuki et al., 2010).

Outros estudos avaliaram o metabolismo de carboidratos no DM. Na glândula PA foi observado um aumento na atividade da enzima hexoquinase, responsável pela fosforilação da molécula de glicose, e da enzima glicogênio sintase, com um aumento no conteúdo total de glicogênio (um importante polissacarídeo sintetizado e armazenado pelas células para posterior degradação e manutenção do metabolismo celular). Além disso, ocorre aumento no conteúdo total de ATP, NAD e NADP, cofatores utilizados principalmente na via glicolítica e das pentoses-fosfato, respectivamente (Nogueira; Nicolau, 2004; Nicolau et al., 2005; Nogueira et al., 2005b; Nicolau et al., 2006). Durante o repouso o fluxo metabólico da glicólise anaeróbica está aumentado enquanto o do ciclo de Krebs reduzido. No estímulo

secretório ocorre uma redução das 2 vias. Na glândula SM foi observada uma redução na atividade da enzima hexoquinase e um aumento da fosfofrutoquinase-1, além do aumento da atividade da enzima glicogênio sintase e do conteúdo de glicogênio. Uma redução no conteúdo total da ATP e cAMP acompanhado de aumento de NADP foram demonstradas nesta glândula (Nogueira; Nicolau, 2004; Nicolau et al., 2005; Nogueira et al., 2005b; Nicolau et al., 2006). No repouso o fluxo metabólico da glicólise anaeróbica não é afetado, sendo observado somente uma redução do fluxo no ciclo de Krebs. Após o estímulo secretório, ocorre a redução das 2 vias.

Recentemente foi demonstrado em ratos (Romero et al., 2012), que a saliva minimamente estimulada por pilocarpina (agonista muscarínico) leva à secreção de uma saliva com menor concentração de ácido siálico em animais diabéticos comparada aos animais controle. O ácido siálico é um monossacarídeo presente na mucina salivar. Sua determinação permite a quantificação indireta desta proteína. Entretanto, esta redução não foi acompanhada de redução de fluxo salivar. Com isso foi sugerido que a xerostomia reportada em pacientes diabéticos pode ter como causa a redução na concentração de mucina na saliva, que levará a secreção de uma saliva pouco viscosa, com baixa capacidade de lubrificação, sendo removida rapidamente da cavidade oral, ocasionando a sensação de boca seca (Romero et al., 2012).

Esses resultados sugerem um comprometimento principalmente na glândula SM, pois a redução do cAMP pode ser responsável pelo comprometimento da secreção da via simpática e a redução do conteúdo de ATP pode levar a uma redução na atividade de diversas enzimas, dentre elas a enzima  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase, responsável pela manutenção do equilíbrio na concentração de  $\text{Ca}^{+2}$ , cuja redução de sua concentração foi reportada recentemente (Nicolau et al., 2009). Além disso, sabendo agora da importância do ciclo de Krebs para a biossíntese de proteínas, o comprometimento do seu funcionamento poderia justificar a redução de secreção de mucina na saliva não estimulada em ratos diabéticos, descrita anteriormente.

### 3 PROPOSIÇÃO

Avaliar em animais o efeito do diabetes induzido por estreptozotocina na presença ou ausência de insulina na produção e atividade de enzimas chave do metabolismo energético em glândula submandibular de ratos.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

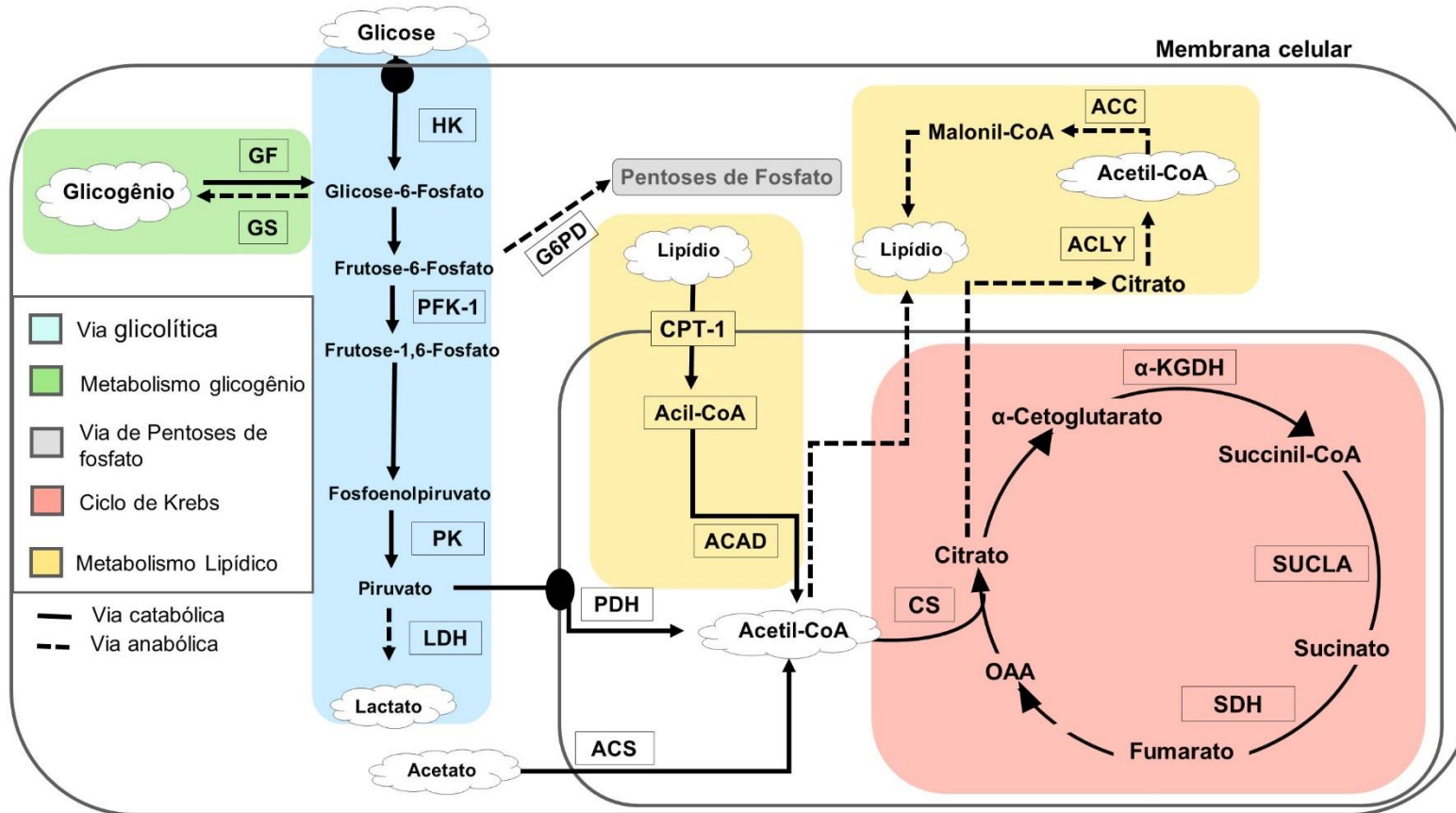
1. Avaliar o efeito do diabetes e da insulina na expressão e na atividade chaves do metabolismo energético.
2. Caracterizar a presença e a relevância do metabolismo lipídico das glândulas submandibulares de ratos.

Para o cumprimento desses objetivos, foi estudado nas glândulas submandibulares o efeito da diabetes e da insulina na expressão e atividade das seguintes enzimas (Figura 3.1):

- Via Glicolítica:
  - Hexoquinase - HK (EC 2.7.1.1)
  - Fosfofrutoquinase - PFK-1 (EC 2.7.1.11)
  - Piruvato Quinase – PK (2.7.1.40)
  - Lactato Desidrogenase – LDH (EC 1.1.1.27)
- Ciclo de Krebs:
  - Piruvato Desidrogenase – PDH (EC 1.2.4.1)
  - Succinato Desidrogenase - SDH (EC 1.3.5.1)
  - Succinil-CoA Sintetase – SUCLA (EC 6.2.1.5)
  - Citrato Sintase - CS (EC 2.3.31)
  - $\alpha$ -Cetoglutarato Desidrogenase -  $\alpha$ -KGDH (EC 1.2.4.2)

- Metabolismo de Lipídeo:
  - Carnitina Palmitoil Transferase 1 - CPT-1 (EC 2.3.1.21)
  - ATP-citrato Liase – ACLY (EC 2.3.3.8)
  - Acetil-CoA Carboxilase - ACC (EC 6.4.1.2)
  - Acetil-CoA Sintase – ACS (EC 6.2.1.1)
  - Acil-CoA Desidrogenase – ACAD (EC 1.3.8.7)
  
- Metabolismo do Glicogênio:
  - Glicogênio Sintase – GS (EC 2.4.1.11)
  - Glicogênio Fosforilase – GF (2.4.1.1)

Figura 3.1 - Esquema metabólico das enzimas alvo do estudo



Legenda:  $\alpha$ -KGDH = Alpha-Cetogluturato Desidrogenase; ACAD = Acetil-CoA Desidrogenase; ACC = Acetil-CoA Carboxilase; ACS = Acetil-CoA Sintase; ACLY = ATP Citrato Liase; CPT-1 = Carinitina Palmitoiltransferase 1; CS = Citrato Sintase; GF = Glicogênio Fosforilase; GS = Glicogênio Sintase; HK = Hexoquinase; LDH = Lactato Desidrogenase; PDH = Piruvato Desidrogenase; PFK-1 = Fosfofructoquinase; PK = Piruvato Quinase; SDH = Succinato Desidrogenase; e SUCLA = Succinil-CoA Sintetase.

Fonte: O autor.





## 4 MATERIAL E MÉTODOS

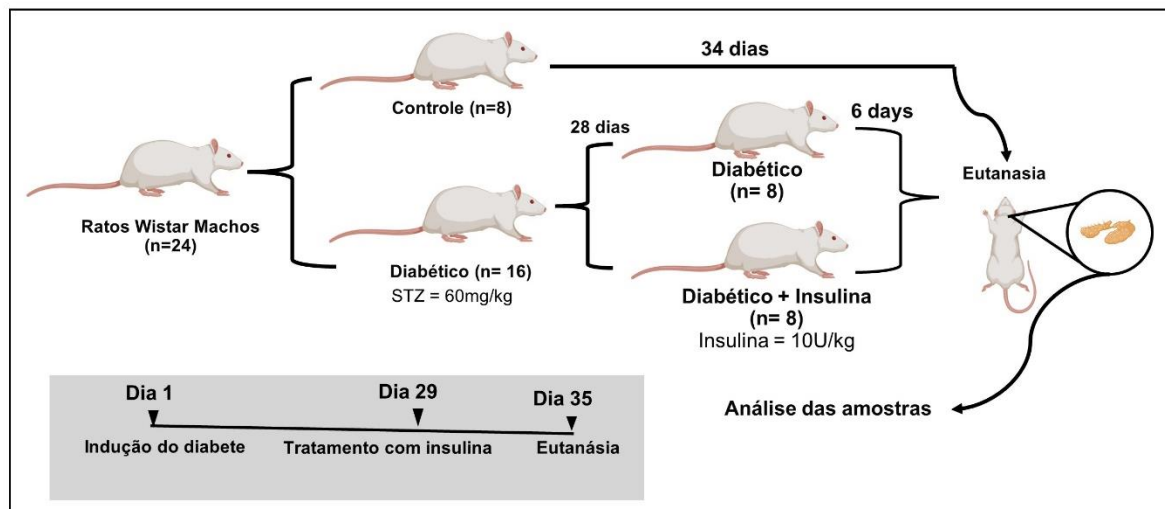
### 4.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado junto a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), respeitando as diretrizes éticas de pesquisa envolvendo animais previstas na lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, bem como dos princípios éticos em experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e outras leis e normativas (Parecer 06/2020 – Anexo A).

### 4.2 ANIMAIS

Foram utilizados 24 ratos da raça Wistar mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de São Paulo (FOUSP) com peso inicial de 250 g aproximadamente. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água e alimento. Os animais foram divididos em 3 grupos: controle (C), diabético (D) e diabético tratado com insulina (D+I). 28 dias após a indução, os animais do grupo D+I receberam doses diárias de insulina (10 U/kg de peso corporal) por 6 dias (Figura 4.1). Os animais dos outros grupos (C e D) receberam o mesmo volume de solução salina. Decorrido este período, todos os animais foram sacrificados, sendo removidas as glândulas SM e sangue total.

Figura 4.1 - Fluxograma experimental



Fonte: O autor.

### 4.3 INDUÇÃO DO DIABETE

Considerando o período de aproximadamente 12 horas em jejum, os animais dos grupos diabéticos (D e D+I) receberam injeção intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg de peso corporal) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,1 M em pH 4,5. O grupo controle recebeu somente o veículo. A glicemia dos animais foi verificada 72 horas após, sendo considerados diabéticos os animais que apresentaram valores de glicemia maiores que 250 mg de glicose/100ml de sangue.

### 4.4 ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA

O tratamento com 10 U/kg de peso corporal de insulina glargina (Lote: 9F059A, Sonofi, Paris, França) por via subcutânea ocorreu por 6 dias.

## 4.5 PERÍODO EXPERIMENTAL

A coleta de material dos animais ocorreu 34 dias após a sua indução ou aplicação de solução salina (Figura 4.1).

## 4.6 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

### 4.6.1 Glândula Salivar

Trinta e quatro dias após a indução, os animais foram sacrificados entre 9:00 e 11:00 para minimizar as variações circadianas. Após a eutanásia dos animais, as glândulas salivares submandibulares foram imediatamente dissecadas, removendo-se o tecido aderente e prensadas entre placas de alumínio. As amostras foram previamente imersas em nitrogênio líquido para imediato congelamento e posteriormente armazenadas em freezer à -80 °C até o momento das análises. O sacrifício dos animais foi realizado por dose letal de anestésico.

### 4.6.2 Sangue

Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca no dia da eutanásia e armazenadas em baixa temperatura em tubos com EDTA a 15%. As amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 min. para separação do soro das células sanguíneas e mantidas em geladeira até o momento das análises.

## 4.7 ANÁLISES

### 4.7.1 Determinação de Glicemia

A determinação da glicemia foi realizada 72 horas após a administração da estreptozotocina antes do início e 72 h após a aplicação de insulina, e no dia do sacrifício dos animais através de um glicosímetro (Accu-Check Advanced - Roche). A glicemia verificada em 72 h realizada para verificar a necessidade de ajuste da dose da insulina no grupo C + I.

### 4.7.2 Determinação de Insulina

Determinação da concentração sérica de Insulina foi determinada através de Elisa (Insulin Rat Elisa Kit, Thermofischer).

### 4.7.3 Expressão Gênica

#### 4.7.3.1 Extração de RNA

Para extração do RNA, 10 mg de glândulas salivares foram coletadas em tubos de 2 mL Precellys® com beads de aço inoxidável (Bertin Technologies, França) contendo 1 mL de reagente Trizol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Os tubos contendo a mistura foram levados à lise mecânica com o homogeneizador Precellys® Evolution (Bertin Technologies, França) sob agitação a 5800 rpm, por 4 ciclos de 15 s, com intervalo de 30 s entre eles. Após a homogeneização, 200 µL de clorofórmio foram adicionados à mistura, seguido por um vórtex de 30 s. Os tubos foram centrifugados a 12.000 × g, 15 min e 4 ° C.

O isolamento do RNA foi realizada empregando a estação de trabalho NIMBUS (Hamilton Company, EUA) e o kit de extração PureLink RNA Mini Kit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com a recomendação do fabricante. A concentração e pureza do RNA extraído para transcrição reversa (RT) foram analisadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

#### 4.7.3.2 Transcrição Reversa

O RNA foi tratado com DNase I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) transcrito (1 µg) em cDNA usando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Após a transcrição reversa, as amostras foram quantificadas para mRNAs usando o sistema Taqman (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para qPCR empregando o equipamento ViiA 7 qPCR machine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Foram utilizados 20 × FAM e mistura de iniciador de sonda marcada com corante MGB (ensaios de Thermo) e 2 × Taqman Fast Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com a recomendação do fabricante.

#### 4.7.3.3 PCR Quantitativo em Tempo Real

A análise quantitativa da expressão dos genes (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) listados no quadro 4.1 foi realizada. O equipamento ViiA 7 qPCR (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) foi usada para quantificar mRNA com ciclos consistindo em um período de 2 min a 50 ° C, depois 10 minutos a 95 ° C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 ° C e 1 min a 60 ° C. Os modelos, a coleta de dados e a análise parcial dos dados foram realizados no software ViiA7 versão 1.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). A expressão de mRNA de todos os genes alvo foram normalizados para o gene de referência Beta-actina e com base

no limiar do ciclo (Ct) determinado em parte pelo controle negativo para cada conjunto de iniciadores e sondas utilizadas. Os valores médios de Ct de medidas duplicadas foram usados para calcular a expressão dos genes alvo, com a fórmula de normalização  $(1 + \text{eficiência})^{-\Delta\Delta C_t}$ .

Quadro 4.1 - Genes analisados

<b>Enzima</b>	<b>Gene</b>	<b>Código de Ensaio</b>
Hexoquinase I	Hk1	Rn00562436_m1
Hexoquinase II	Hk2	Rn00562457_m1
Hexoquinase III	Hk3	Rn00573299_m1
Fosfofrutoquinase I, musculo	Pfkm	Rn00581848_m1
Fosfofrutoquinase I, plaqueta	Pfkp	Rn01487769_m1
Piruvato Quinase	Pkm	Rn00583975_m1
Piruvato Quinase	Pklr	Rn01455286_m1
Lactado Desidrogenase	Ldha	Rn00820751_g1
Glicogênio Sintase 1	Gys1	Rn01476417_m1
Glicogênio Sintase 2	Gys2	Rn00565296_m1
Glicose-6-fosfato desidrogenase	G6pd	Rn01529640_g1
Glicogênio Fosforilase	Pygm	Rn01479681_m1
Piruvato Desidrogenase	Pdhx	Rn04218872_m1
Citrato Sintase	Cs	Rn00756225_m1
Sucinato Desidrogenase	Sdh	Rn01412110_g1
Acil-CoA Desidrogenase	Acads	Rn00574634_m1
Acil-CoA sintetase de Cadeia Curta 1	Acss1	Rn01536317_m1
Succinil-CoA Sintetase	Sucla2	Rn01465899_m1
Alpha-Cetoglutarato Desidrogenase	Ogdh	Rn01443655_m1
Carinitina Palmitoiltransferase 1 <sup>a</sup>	Cpt1a	Rn00580702_m1
ATP Citrato Liase	Acly	Rn00566411_m1
Acetil-CoA Carboxilase Beta	Acacb	Rn00588290_m1
Beta Actina	Actb	Rn00667869_m1

Fonte: O autor.

#### 4.7.4 Determinação de Proteína Total

A determinação da concentração de proteína total nas amostras nos homogenato de glândulas salivares foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e albumina do soro bovino como padrão (Lowry et al., 1951).

#### 4.7.5 Atividades Enzimáticas

As glândulas removidas foram pesadas e homogeneizadas a 10%. Para este experimento o meio de homogeneização consistiu de imidazol 50 mM, EDTA 2 mM e mercapto-etanol 1 mM. Posteriormente foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para determinação das atividades enzimáticas. Para análise de atividades enzimáticas, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Beckman DU-800 (Beckman, Fullerton, CA).

##### 4.7.5.1 Hexoquinase

O meio de reação consistiu de 6 mL de imidazol 0,1 M, 0,29 mL de  $MgCl_2$  0,2 M, 0,6 mL de ATP 0,1 M, 1,2 mg de NADP, 10  $\mu$ L de G6PD e água destilada q.s.p 12 mL. Em cubeta foi adicionado 0,9 mL de meio de reação, 0,02 mL do homogenato, e 0,01 mL de glicose para um volume final de 0,93 mL (Uyeda; Racker, 1965). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu$ mol de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

##### 4.7.5.2 Fosfofrutoquinase

Em cubeta foi adicionado 0,9 mL de meio de reação, 20  $\mu$ L do homogenato, e 20  $\mu$ L de ATP 0,1 M para um volume final de 0,94 mL. O meio de reação consistiu de 6 mL de TEA, 0,24 mL de EDTA 0,1 M, 0,29 mL de  $MgCl_2$ , 0,12 mL de NADH (10 mg/mL), 3,6 mg de frutose-6-fostato, 20  $\mu$ L de aldolase, 10  $\mu$ L de alfa-glicerofostato desidrogenase, 8  $\mu$ L de TIM 0,8 U (5  $\mu$ L em 2 mL de  $(NH_4)_2SO_4$  3,2 M) e água destilada q.s.p 12 mL (Uyeda, 1979). A leitura foi realizada no comprimento de onda

de 340 nm por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.3 Piruvato Quinase

O meio de reação consistiu de 6 mL de imizadol 0,1 M, 0,29 mL de  $\text{MgCl}_2$  0,2 M, 1,20 mL de KCL 1,0 M, 0,12 mL de ADP 0,1 M, 0,12 mL de NADH (10 mg/mL), 11,7 mg de PEP e água destilada q.s.p 12 mL. Em cubeta foi adicionado 0,9 mL de meio de reação, 20  $\mu\text{L}$  do homogenato, e 10  $\mu\text{L}$  de LDH 0,97 U para um volume final de 0,93 mL (Llorente et al., 1970). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.4 Lactado Desidrogenase

Em cubeta foi adicionado 0,9mL de tampão fosfato/piruvato, 10 $\mu\text{l}$  de homogenato (diluído 1:10) e 10  $\mu\text{L}$  de NADH (11,3 mM) com volume final de 0,92 mL. Tampão fosfato / piruvato (50 mM / 0,62 mM, pH 7,5) é composto por 700 mg de  $\text{k}_2\text{HPO}_4$ , 90 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6,2 mg de Piruvato de sódio e água destilada q.s.p 12 mL (Bergmeyer, 1974). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.



#### 4.7.5.5 Glicose-6-fosfato Desidrogenase

O meio de reação consistiu de 6 mL Tris-HCL 0,1M, 0,22 mL de MgCl<sub>2</sub> 0,2 M, 1,2 mg de NADP e água destilada q.s.p 12 mL. Em cubeta foi adicionado 0,9 mL de meio de reação, 20 µL do homogenato, e 100 µL de Glicose-6-Fosfato (4.5 mg/mL) para um volume final de 1,02 mL. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min (Glock; McLean, 1953). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 µmol de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.6 Piruvato Desidrogenase

Em cubeta foi adicionado NAD 2,5 mM, pirofosfato de tiamina 0,2 mM, 0,1 mM de COA, ditioeritritol 0,3 mM, 5 mM de piruvato, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 10 µL de homogenato. O branco foi determinado pela empregando toda a mistura de reação, exceto o piruvato (Hinman; Blass, 1981). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 µmol de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.7 Acetil-CoA Sintase

Em cubeta com volume final de 1 mL foi adicionado 0,5 mL de Tris-HCL 50 mM (pH 7,4), 0,26  $\mu$ L de fosfato de potássio 40 mM, 0,1 mL de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 50  $\mu$ L de DTNB 50 mM, 50  $\mu$ L de Acetil-CoA 0,05 mM, 40  $\mu$ L de ADP 2 mM e 10  $\mu$ L de homogenato. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 412 nm por 10 min. O aumento na absorbância 412 nm devido a formação de tiofenolato foi observado. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como 1  $\mu$ mol de CoA liberado por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar 13.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Sanchez; Müller, 1996). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.8 Citrato Sintase

A atividade de citrato sintase foi realizada mediante kit comercial disponível (MAK193-1KT, sigma, lote: 6H19KU3180) segundo as recomendações do fabricante. A atividade de CS foi determinada usando uma reação enzimática acoplada, que resulta em um produto colorimétrico (412 nm) proporcional à atividade enzimática presente. A absorbância a 412 nm foi acompanhada a cada 5 minutos por 40 minutos. A atividade de citrato sintase foi calculada como a quantidade de GSH (nmol) gerada na amostra entre o leitura inicial e final da curva padrão dividido pelo tempo de reação multiplicado pela tomada de ensaio. Uma unidade de CS foi definida como a quantidade de enzima que gera 1,0  $\mu$ mol de CoA por minuto a 25 °C e pH 7,2. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.9 Succinil-CoA Sintetase

Em cubeta de 1 mL foi adicionado 0,5 mL de Tris succinato pH 7,4 (Succinato 0,1 M e aproximadamente 0,22 M de Tris base, 0,1 mL de  $MgCl_2$  0,1 M, 0,1 mL de GTP 1 mM e 0,1 mL de CoA 1 mM, 10  $\mu L$  de homogenato e água destilada q.s.p. 1,0 mL. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 235 nm por 10 min (Cha; Parks, 1964). Uma unidade de atividade da enzima foi definida como 1  $\mu mol$  de CoA liberado por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar  $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.10 Alfa-Cetoglutarato Desidrogenase

Em cubeta foi adicionado 40  $\mu L$  de pirofosfato de tiamina 5 mM, 40  $\mu L$  de NAD 50 mM, 20  $\mu L$  de  $MgCl_2$  50 mM, 6  $\mu L$  de ditioeritritol 50 mM, 100  $\mu L$  de Triton X-100, 100  $\mu L$  de alfa-cetoglutarato 100 mM, 674  $\mu L$  de HEPES – Tris 144 mM (pH 7,4) e 20  $\mu L$  de homogenato. A solução foi incubada a 30°C por 2 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 40  $\mu L$  de COA 5 mM. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min (Lai; Cooper, 1986). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu mol$  de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.11 Succinato Desidrogenase

Em cubeta (volume final de 1 mL) foi adicionado 50  $\mu L$  de Tampão fosfato de potássio 1 M (pH 7,4), 20  $\mu L$  de Succinato de sódio 1 M (pH 7,3 – 7,4), 10  $\mu L$  de EDTA 0.01 M (pH 7,3), 100  $\mu L$  de albumina 1%, 777  $\mu L$  de água destilada, 16  $\mu L$  de DCIP 4,5 mM, 25  $\mu L$  de Metosulfato de fenazina 65 mM e 2  $\mu L$  de homogenato das

glândulas salivares. A reação começa com a adição da amostra. A redução do DCIP foi monitorada no comprimento de onda de 600 nm por 10 min. Uma unidade de atividade da enzima foi definida utilizando o coeficiente de extinção molar da redução do DCIP ( $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (Hatefi; Stiggall, 1978). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.12 Carinitina Palmitoil Transferase 1

O meio de reação consistiu em uma mistura com volume final de 0,95 mL contendo Tris-HCL (0,1 M; pH 8.0), L-carnitina 1,25 mM, DTNB 0,125 mM, Palmitoil-CoA 0,038 mM e amostra. A reação se inicia com adição de 10  $\mu\text{L}$  da amostra e a leitura realizada à 233 nm por 10 min. Uma unidade de atividade da enzima foi definida como 1  $\mu\text{mol}$  de CoA liberado por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar  $13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (West et al., 1971). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.13 Acetil-CoA Carboxilase

Em cubeta com volume final de 1 mL foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de Tris-HCL 50mM (pH 7,5), 100  $\mu\text{L}$  de citrato de potássio 10mM, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  10 mM, 75  $\mu\text{L}$  de Glutathiona Reduzida 3.75mM, 75  $\mu\text{L}$  de Albumina 0.75 mg/mL, 13  $\mu\text{L}$  de Acetil-CoA 0.125  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{L}$  de PEP 0.5 mM, 13  $\mu\text{L}$  de NADH 0.125 mM, 0,8  $\mu\text{L}$  de piruvato quinase 10 KU, 0,8  $\mu\text{L}$  de LDH 25 KU, 368  $\mu\text{L}$  de água destilada e 10  $\mu\text{L}$  de homogenato. A mistura foi deixada a temperatura ambiente por 1 min. Após este período, a reação foi iniciada com ATP 3,75 mM e monitorada no comprimento de onda de 340 nm por 10 min (Tanabe et al., 1981). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.14 ATP-citrato Liase

A ATP citrato liase foi testada por reação acoplado a malato desidrogenase (Antranikian et al., 1982). Em cubeta com volume final de 1 mL foi adicionado tampão Tris-cloridrato 0,1 M (pH 8,5),  $MgCl_2$  4 mM, ditioeritritol 5 mM, ATP 2 mM, CoA 0,2 mM, citrato de sódio 4 mM, 0,5 U de malato desidrogenase, 0,28 mM NADH e homogenato. A reação foi iniciada com ATP, e a taxa de oxidação de NADH foi medida a 366 nm a 30 °C. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que converte 1  $\mu$ mol de substrato por minuto utilizando o coeficiente de extinção molar do NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.15 Acetil-CoA Desidrogenase

Em cubeta com volume final de 1 mL foi adicionado 779  $\mu$ L de  $K_2HPO_4$  0,13 M (pH 7,6), 50  $\mu$ L de DCIP 1mM, 70  $\mu$ L de etosulfato de fenazina 50 mM, 20  $\mu$ L de N-Ethylmaleimida 10 mM, 40  $\mu$ L de KCN 10mM, 1  $\mu$ L de triton x-100, e 10  $\mu$ L de homogenato. A mistura foi deixada a temperatura ambiente por 1 min. A reação foi iniciada pela adição de 40  $\mu$ L de Palmitoyl-CoA 1,5mM e monitorada por 10 min a 600 nm. A redução do DCIP foi monitorada no comprimento de onda de 600 nm por 10 min (Verity; Turnbull, 1993). Uma unidade de atividade da enzima foi definida utilizando o coeficiente de extinção molar da redução do DCIP ( $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.16 Glicogênio Sintase

As glândulas foram homogeneizadas a 20% (peso / volume) em meio contendo sacarose 25 mM, EDTA 10 mM, ditioeritritol 10 mM e imidazol 100 mM, pH 7,4. Após centrifugação a 5.000 x g por 20 min, uma alíquota do sobrenadante foi incubada a 37 ° C por 30 min na presença de glicilglicina 250 mM, EDTA 50 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, ditioeritritol 50 mM, UDP-G 50 mM e 1,2 mg de glicogênio, para ensaio de glicogênio sintase ativa. A quantidade de UDP formada foi medida por ensaio espectrofotométrico a 520 nm após incubação na presença de PEP 10 mM, 0,2 U de piruvato quinase e 0,1% de DNFH por 30 min. A glicogênio sintase total foi determinada no mesmo meio de incubação que para a sintase ativa, exceto que 100 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi substituído por 100 mM de glicose-6-fosfato (Chiang, 1977). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que forma 1 μmol de piruvato por minuto. A atividade específica é expressa em U/mg de proteína.

#### 4.7.5.17 Glicogênio Fosforilase

As glândulas foram homogeneizadas a 10% (peso / volume) com uma solução contendo NaF 100 mM, EDTA 20 mM, glicogênio 0,5% e tampão glicilglicina 50 mM, pH 7,4. O sobrenadante obtido por centrifugação a 4.400 x g por 30 min foi utilizado. A fosforilase ativa foi determinada em meio contendo 100 mM de glicose-1-fosfato, 2% de glicogênio, NaF 0,3 mM e cafeína 1 mM, pH 6.1. A fosforilase total foi determinada em meio contendo: glicose-1-fosfato 100 mM, NaF 0,3 mM, AMP 1 mM, glicogênio 2%, ATP 3 mM e MgSO<sub>4</sub> 5 mM, pH 6,1 (Hue et al., 1975). A reação foi interrompida com solução de TCA 19%, e o fosfato inorgânico liberado foi medido. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima que forma 1 μmol de fosforo por minuto (Lowry; Lopez, 1946). A atividade específica é expressa em U/mg de proteína.

#### **4.7.6 Determinação da Quantidade Total de Enzimas**

A determinação da quantidade total de enzimas foi realizada somente nos casos onde encontrarmos discrepância entre expressão gênica e atividade enzimática. Neste caso, baseado nos resultados obtidos, a determinação da quantidade total de enzimas foi realizada para glicogênio fosforilase (RAT PYGM ELISA kit, catálogo: ER1303, Glycogen Phosphorylase, Muscle. Lote: R1303G053, FineTest), lactato desidrogenase (Rat D-LDH ELISA Kit, catálogo: E-EL-R0338, Lote: 6RS4XLS83L, Elabscience®) e alfa-cetoglutarato desidrogenase (Rat OGDH(2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial) ELISA Kit, catálogo: E-EL-R1212, Lote: E9GCYKPTW, Elabscience®).

#### **4.7.7 Análises Estatísticas**

Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo obtido um valor médio para cada glândula. A distribuição normal dos dados foi verificada por meio do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o teste de Levene foi utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, Inc., CA, US).





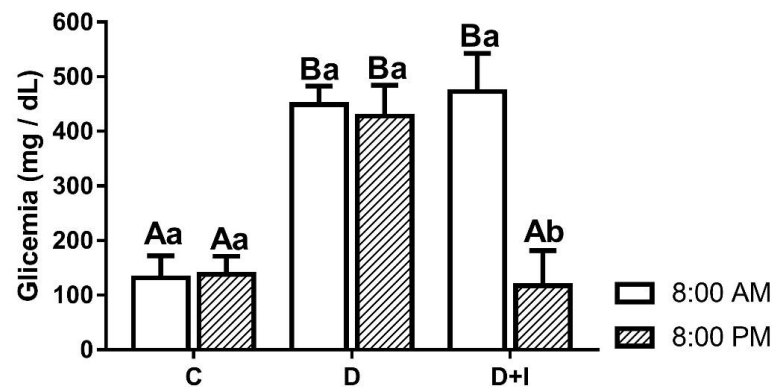
## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS DOS ANIMAIS

Para melhor compreensão do efeito da insulina, os resultados de glicemia (mg/dL), massa (g), consumo de ração (g/kg de massa corporal) e água (mL/kg de massa corporal) são apresentados em dois tempos: T1 - compreendido entre a indução de diabetes por STZ ou aplicação de tampão citrato nos controles e o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D; e T2 - compreendido entre o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D, e a eutanásia dos animais.

#### 5.1.1 Glicemia

Figura 5.1 – Valores de glicemia 72 h do início do tratamento com insulina aferidos antes (8:00 AM) e após 12 h (8:00 PM) da administração

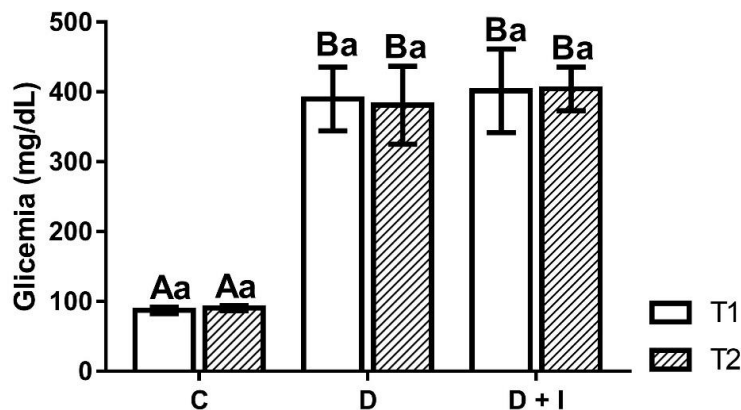


Legenda: C = controle; D = diabético; D + I = Diabéticos tratados com insulina; T1 = compreendido entre a indução de diabetes por STZ ou aplicação de tampão citrato nos controles e o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D; T2 = compreendido entre o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D, e a eutanásia dos animais. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período de avaliação (One-way ANOVA com *Tukey*,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de avaliação (T1 e T2) para o mesmo grupo (Múltiplos testes *t* de student pareados,  $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

No terceiro dia após o início do tratamento com insulina, os valores de glicemia foram analisados antes (8:00 AM) e após 12 h (8:00 PM) da administração de insulina para possível ajuste da dose (Figura 5.1). Os resultados evidenciaram que os animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores de glicemia em relação ao grupo controle considerando os dois tempos experimentais ( $p < 0,05$ ). Ainda, a administração de insulina foi capaz de normalizar os valores de glicemia após 12 h da administração ( $p < 0,05$ ).

Figura 5.2 – Valores de glicemia antes e após o tratamento com insulina



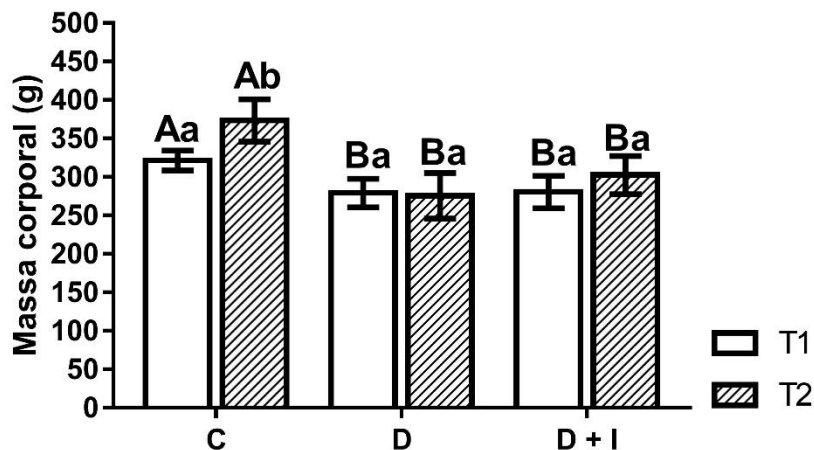
Legenda: C = controle; D = diabético; D + I = Diabéticos tratados com insulina; T1 = compreendido entre a indução de diabetes por STZ ou aplicação de tampão citrato nos controles e o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D; T2 = compreendido entre o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D, e a eutanásia dos animais. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período de avaliação (One-way ANOVA com *Tukey*,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de avaliação (T1 e T2) para o mesmo grupo (Múltiplos testes *t* de student pareados,  $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na figura 5.2 observado mostram que os animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores de glicemia em relação ao grupo controle considerando os dois tempos experimentais ( $p < 0,05$ ). Ainda, a administração de insulina não foi capaz de normalizar os valores de glicemia ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.2 Massa Corporal

Figura 5.3 – Massa dos animais (em gramas)



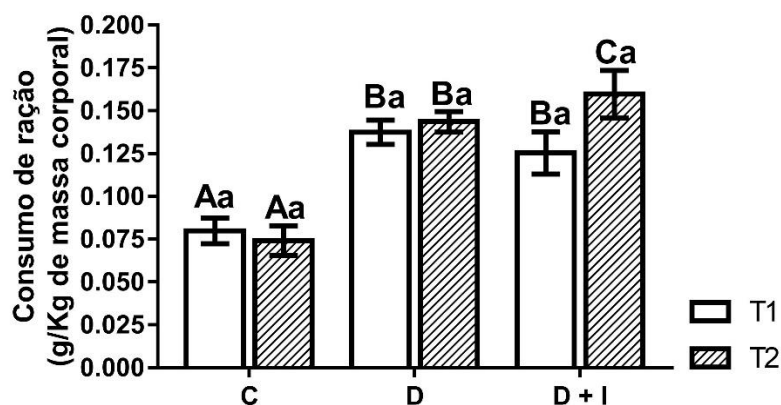
Legenda: C = controle; D = diabético; D + I = Diabéticos tratados com insulina; T1 = compreendido entre a indução de diabetes por STZ ou aplicação de tampão citrato nos controles e o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D; T2 = compreendido entre o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D, e a eutanásia dos animais. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período de avaliação (One-way ANOVA com *Tukey*,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de avaliação (T1 e T2) para o mesmo grupo (Múltiplos testes *t* de student pareados,  $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

Os resultados apresentados na figura 5.3 mostram que os animais diabéticos apresentaram diminuição de peso corporal quando comparados com o controle ( $p < 0,05$ ). Somente para os animais do grupo controle, houve um aumento significativo em termos de ganho de massa corporal entre T1 e T2 ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.3 Consumo de Ração

Figura 5.4 – Consumo de ração (g / kg de massa corporal)



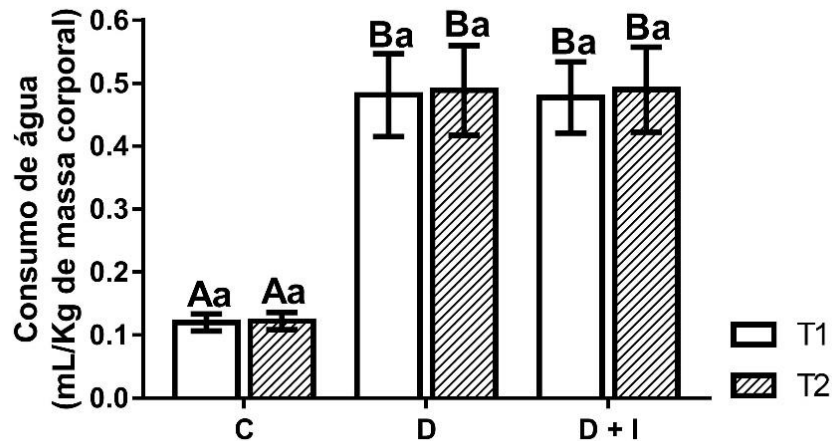
Legenda: C = controle; D = diabético; D + I = Diabéticos tratados com insulina; T1 = compreendido entre a indução de diabetes por STZ ou aplicação de tampão citrato nos controles e o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D; T2 = compreendido entre o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D, e a eutanásia dos animais. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período de avaliação (One-way ANOVA com *Tukey*,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de avaliação (T1 e T2) para o mesmo grupo (Múltiplos testes *t* de student pareados,  $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

Os animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no consumo de ração (Figura 5.4). Interessantemente, animais diabéticos tratados com insulina apresentaram um aumento significativo no consumo de ração no T2 quando comparado com T1 ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.4 Consumo de Água

Figura 5.5 – Consumo de água (mL / kg de massa corporal)



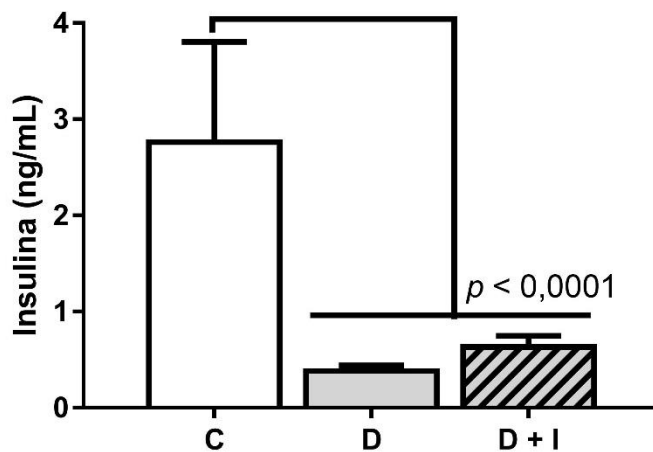
Legenda: C = controle; D = diabético; D + I = Diabéticos tratados com insulina; T1 = compreendido entre a indução de diabetes por STZ ou aplicação de tampão citrato nos controles e o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D; T2 = compreendido entre o início da administração de insulina nos ratos do grupo D+I e aplicação de solução salina nos grupos C e D, e a eutanásia dos animais. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos considerando o mesmo período de avaliação (One-way ANOVA com *Tukey*,  $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os diferentes períodos de avaliação (T1 e T2) para o mesmo grupo (Múltiplos testes *t* de student pareados,  $p < 0,05$ ).

Fonte: o autor

Comparado com os animais do grupo controle, os animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no consumo de água (Figura 5.5).

### 5.1.5 Insulina

Figura 5.6 - Quantificação de insulina



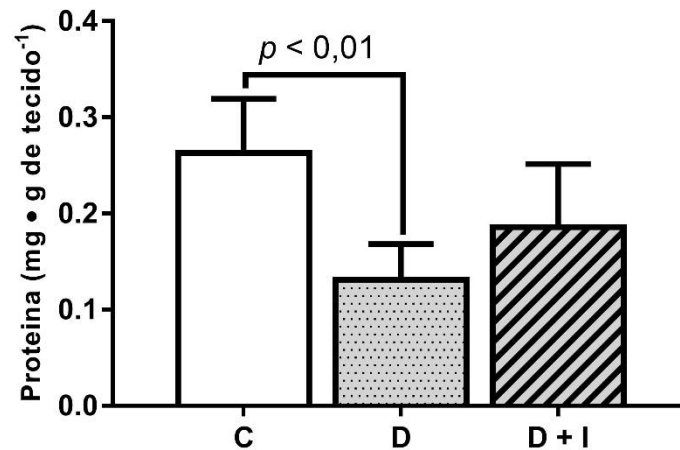
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Os dados apresentados na figura 5.6 mostram que os ratos diabéticos apresentaram níveis basais significativamente menores de insulina ( $p < 0,0001$ ). Mesmo embora uma tendência ao aumento da quantificação total de insulina tenha sido observada nos animais que receberam o tratamento com insulina, isto não foi estatisticamente significativo.

## 5.2 PROTEÍNA TOTAL

Figura 5.7 – Proteína total nas glândulas salivares submandibulares



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

O conteúdo de proteína total foi diminuído nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.7). A administração de insulina nos animais diabéticos levou a um aumento significativo na quantificação de proteína total nas glândulas submandibulares ( $p < 0,05$ ).

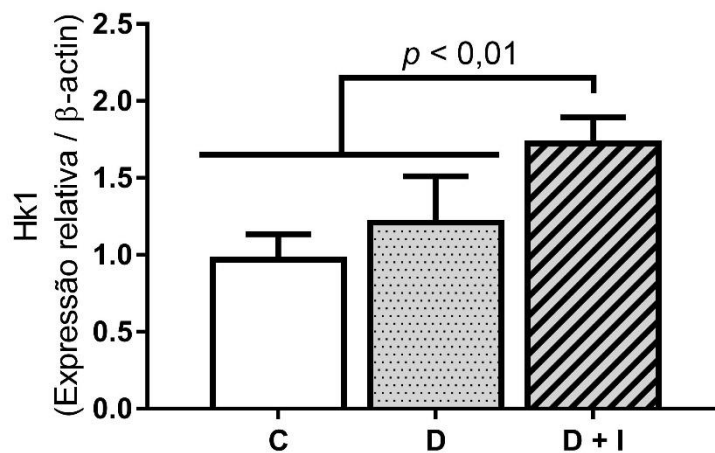
## 5.3 EXPRESSÃO GÊNICA, QUANTIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados de expressão foram analisados com base no valor de CT (cicle threshold – ou ciclo limiar), determinado com base no controle negativo (sem amostra). As médias dos valores de CT de medidas em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização ao controle endógeno, e então comparados com o controle alvo-interno (grupo controle) para o cálculo da quantificação relativa. O conteúdo das enzimas foi normalizado por grama de tecido. As atividades enzimáticas foram normalizadas pela proteína total no homogenato.

### 5.3.1 Hexoquinase

Para os ensaios de expressão gênica, três isoformas da enzima hexoquinase foram analisadas: Hexoquinase 1 (Hk1), Hexoquinase 1 (Hk2), e Hexoquinase 3 (Hk3).

Figura 5.8 – Quantificação relativa de mRNA da hexoquinase 1



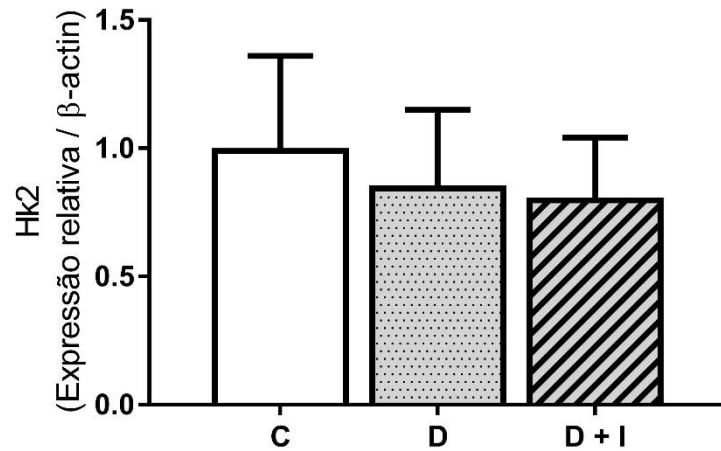
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: o autor.

Para Hk1 (Figura 5.8) não houve diferença na expressão relativa entre os animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ). No entanto, um aumento significativo na expressão desta enzima foi encontrado no grupo diabético tratado com insulina ( $p < 0,01$ ).



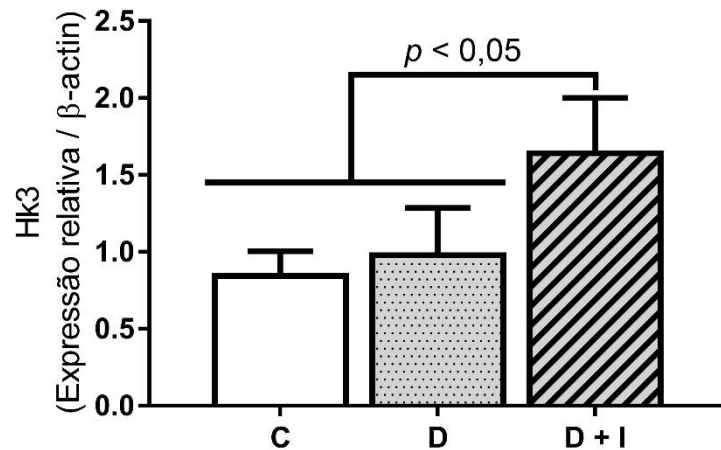
Figura 5.9 – Expressão relativa de mRNA da hexoquinase 2



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos. Fonte: o autor.

Para Hk2 (Figura 5.9) não houve diferença na expressão relativa entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ).

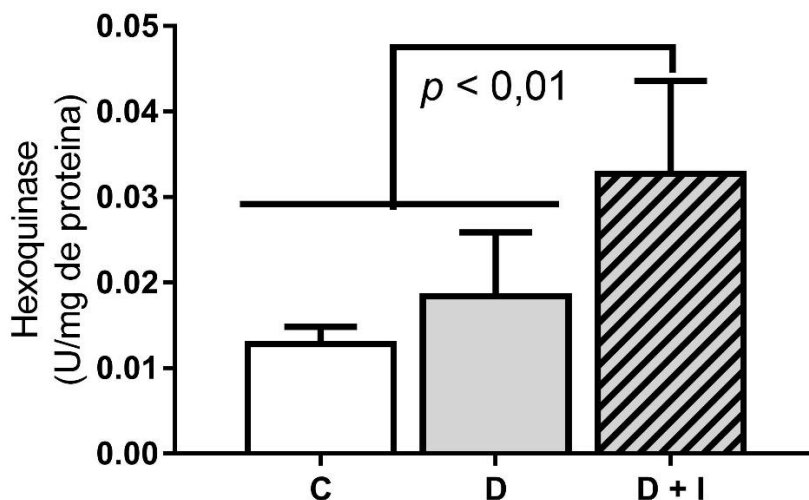
Figura 5.10 – Expressão relativa de mRNA da hexoquinase 3



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos. Fonte: o autor.

Para Hk3 (Figura 5.10) não houve diferença na expressão relativa entre os animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ). No entanto, um aumento significativo na expressão desta enzima foi encontrado no grupo D+I ( $p < 0,01$ ).

Figura 5.11 – Atividade enzimática da hexoquinase



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

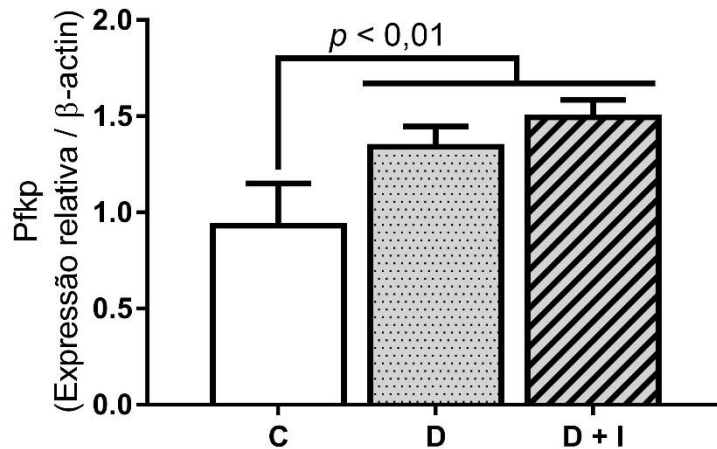
A figura 5.11 mostra que a indução do diabetes por STZ não causou alterações significativas em relação aos controles para atividade de hexoquinase ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a administração de insulina nos ratos diabéticos levou a aumento significativo da atividade desta enzima ( $p < 0,01$ ).

### 5.3.2 Fosfofrutoquinase

Para os ensaios de expressão gênica, a enzima fosfofrutoquinase expressa tanto em plaqueta (Pfkp) quando em músculo (Pfkm) foi analisada.

Para Pfkp (Figura 5.12) houve um aumento na sua expressão relativa nos diabéticos e diabéticos tratados comparados com os controles ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença significativa entre os animais diabéticos e os diabéticos tratados com insulina ( $p > 0,05$ ).

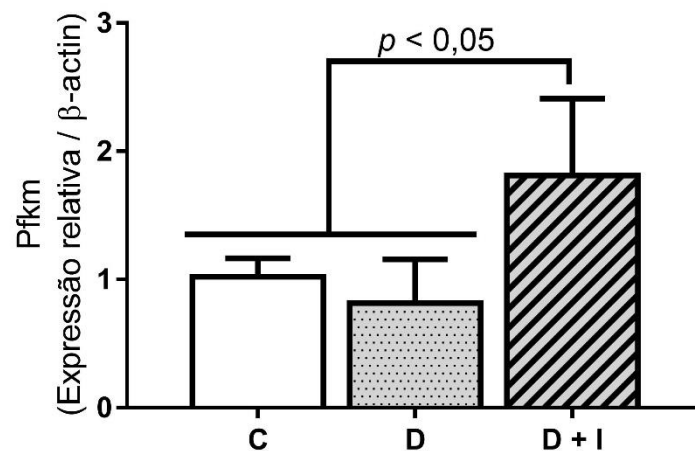
Figura 5.12 – Expressão relativa de mRNA da fosfotruoquinase 1 (plaqueta)



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Figura 5.13 – Expressão relativa de mRNA da fosfotruoquinase 1 (músculo)

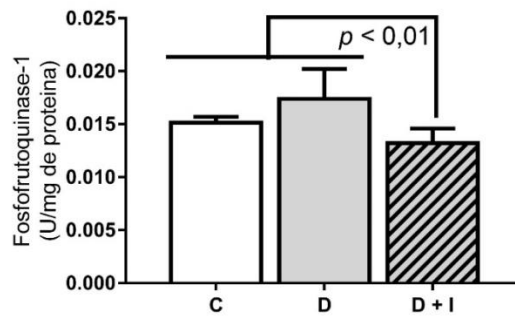


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: o autor.

Não houve diferença significativa na expressão relativa de PfkM (Figura 5.13) nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,01$ ). No entanto, animais diabéticos tratados com insulina apresentaram um aumento significativo na expressão relativa desta enzima quando comparados com animais controles e diabéticos não tratados ( $p < 0,05$ ).

Figura 5.14 – Atividade enzimática de fosfofrutoquinase-1



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

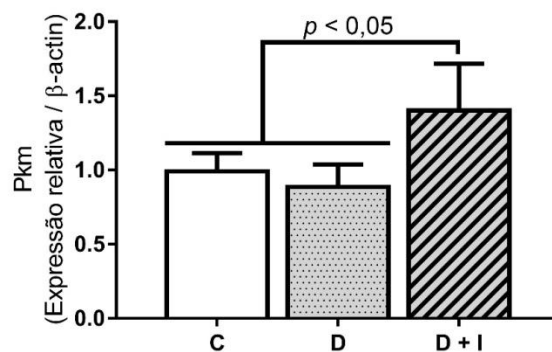
Fonte: O autor.

A indução do estado diabético levou a um aumento significativo da atividade de PFK-1, em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e a administração de insulina levou a uma diminuição dessa atividade ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.14).

### 5.3.3 Piruvato Quinase

Para os ensaios de expressão gênica, a piruvato quinase expressa tanto em músculo (Pkm) quanto em fígado e células vermelhas do sangue (Pklr) foram analisadas (Figuras 5.15 e 5.16).

Figura 5.15 – Expressão relativa de mRNA da piruvato quinase (músculo)

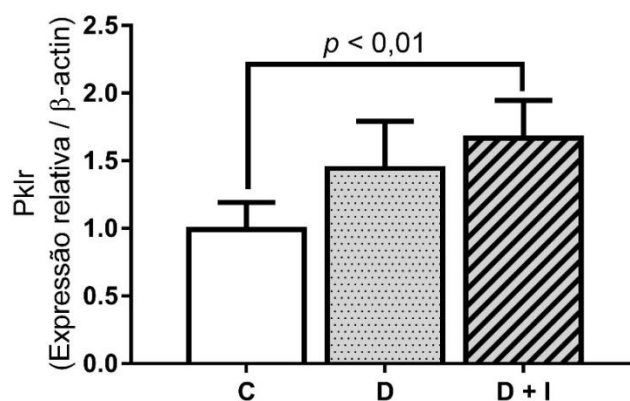


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença significativa na expressão relativa de Pkm nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,01$ ) (Figura 5.15). No entanto, animais diabéticos tratados com insulina apresentaram um aumento significativo na expressão relativa desta enzima quando comparados com animais controles e diabéticos ( $p < 0,05$ ).

Figura 5.16 – Expressão relativa de mRNA da piruvato quinase (fígado e células vermelhas do sangue)

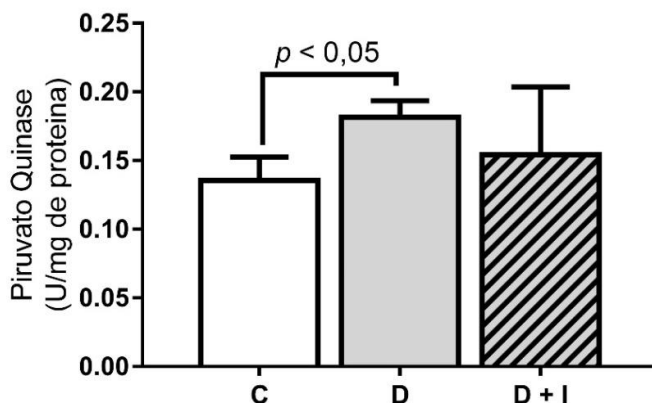


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Para Pklr não houve diferença na expressão relativa nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.16). No entanto, animais diabéticos tratados com insulina apresentaram um aumento significativo na expressão relativa quando comparados com os controles ( $p < 0,01$ ). Não houve diferença significativa na expressão relativa desta enzima nos animais diabéticos tratados com insulina comparados com não tratados ( $p > 0,05$ ).

Figura 5.17 – Atividade enzimática de piruvato quinase



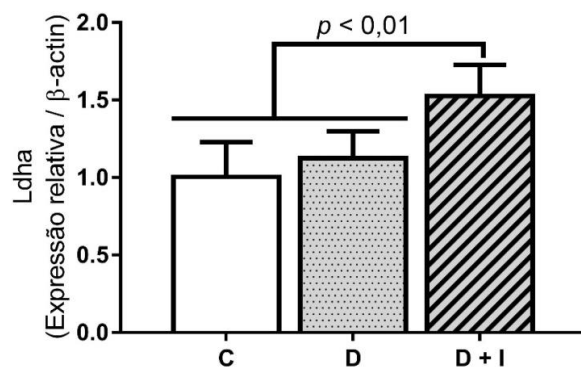
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Os resultados mostram um aumento significativo da atividade de PK nos animais diabéticos comparados com controle ( $p < 0,05$ ), havendo normalização da atividade com a administração de insulina ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.17).

### 5.3.4 Lactado Desidrogenase

Figura 5.18 – Expressão relativa de mRNA de lactato desidrogenase

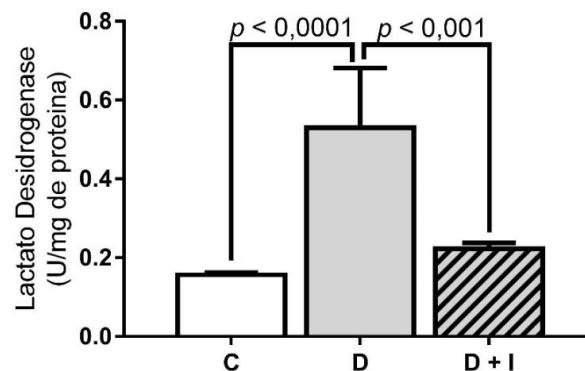


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA da enzima lactato desidrogenase nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.18). A administração de insulina levou a um aumento na expressão desta enzima o que foi significativamente maior que nos animais controles e diabéticos não tratados ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.19).

Figura 5.19 – Atividade enzimática de lactato desidrogenase

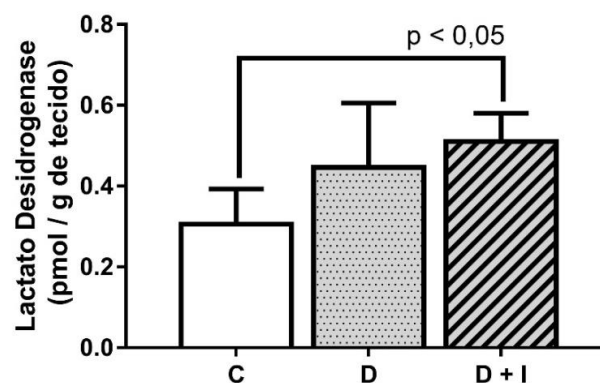


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Animais diabéticos apresentaram um aumento significativo na atividade desta enzima ( $p < 0,0001$ ) a qual diminuída pela administração de insulina ( $p < 0,001$ ) (Figura 5.19).

Figura 5.20 – Quantificação total da enzima lactato desidrogenase



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

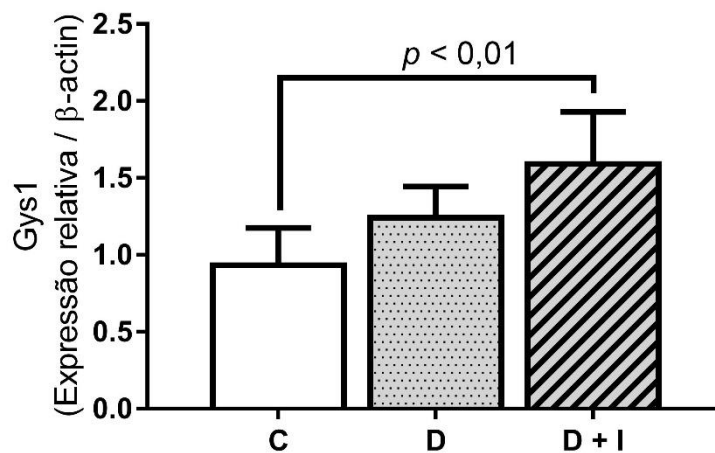
Fonte: O autor.

Não houve diferença na quantificação total da enzima lactato desidrogenase (Figura 5.20) entre os grupos deste estudo ( $p > 0,05$ ).

### 5.3.5 Glicogênio Sintase

Duas isoformas de glicogênio sintase foram investigadas e expressas no presente estudo: glicogênio sintase 1 (Gys1) e glicogênio sintase 2 (Gys2).

Figura 5.21 – Expressão relativa de mRNA de glicogênio sintase 1



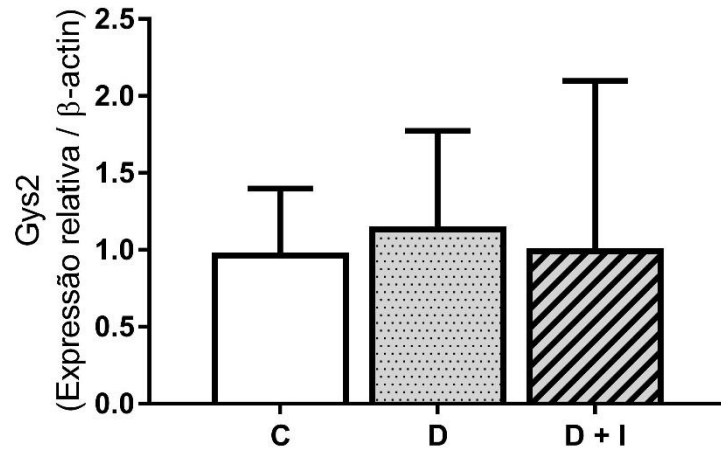
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA de glicogênio sintase 1 nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.21). A administração de insulina, levou a um aumento na expressão desta enzima, a qual foi significativamente maior que nos animais do grupo controle ( $p < 0,01$ ).



Figura 5.22 – Expressão relativa de mRNA de glicogênio sintase 2

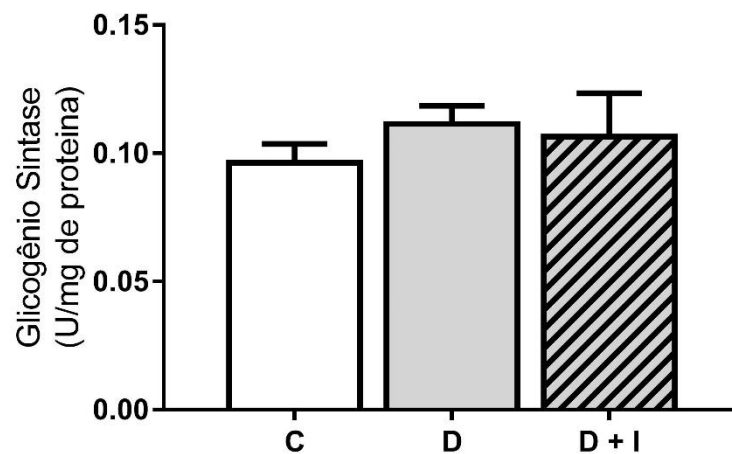


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA de glicogênio sintase 2 entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.22).

Figura 5.23 – Atividade enzimática de glicogênio sintase



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

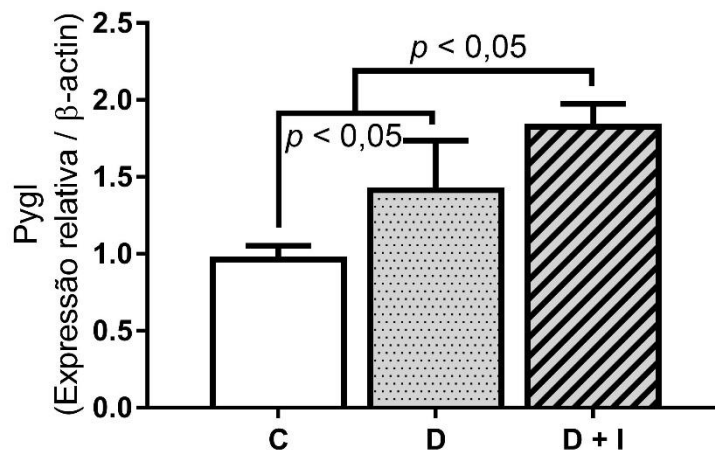
Fonte: O autor.

A expressão relativa na atividade de glicogênio sintase nos animais entre os grupos deste estudo ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.23).

### 5.3.6 Glicogênio Fosforilase

No presente estudo, para enzima glicogênio fosforilase foram investigados os genes para glicogênio fosforilase presente no fígado (Pygl) e no músculo (Pygm).

Figura 5.24 – Expressão relativa de mRNA de glicogênio fosforilase (fígado)

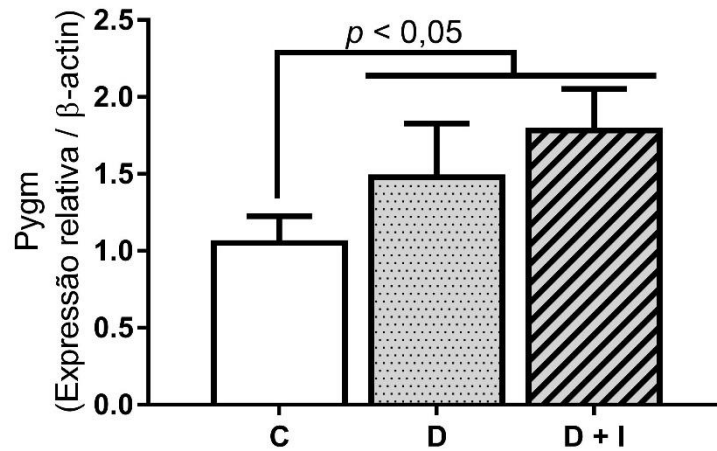


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A expressão relativa de mRNA da Pygl foi significativamente maior nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.24). A administração de insulina levou a um aumento na expressão desta enzima, a qual foi significativamente maior que em C e D+I ( $p < 0,05$ ).

Figura 5.25 – Expressão relativa de mRNA de glicogênio fosforilase (músculo)

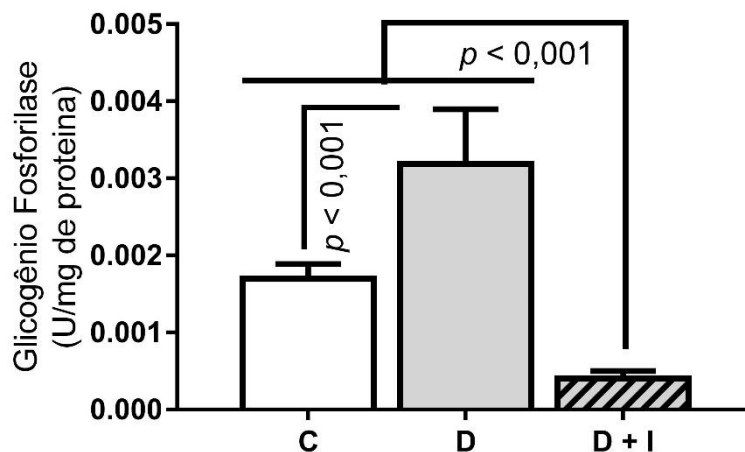


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Para Pygm, houve um aumento de expressão relativa de mRNA nos animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina comparados com os controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.25). Não houve diferença significativa entre diabéticos e diabéticos tratados com insulina ( $p > 0,05$ ).

Figura 5.26 – Atividade enzimática de glicogênio fosforilase

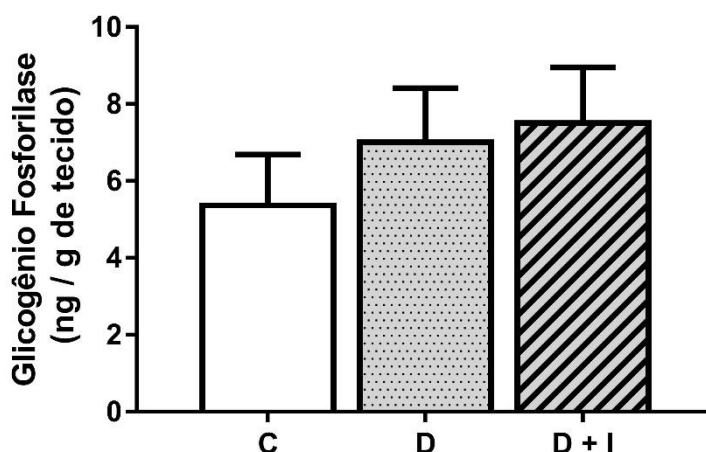


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A atividade da enzima glicogênio fosforilase foi significativamente maior nos animais diabéticos comparada com animais do grupo controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 5.26 ). A administração de insulina, levou a uma diminuição da atividade desta enzima, a qual foi significativamente menor que grupo controle e diabéticos não tratados ( $p < 0,001$ ).

Figura 5.27 – Quantidade total da enzima glicogênio fosforilase



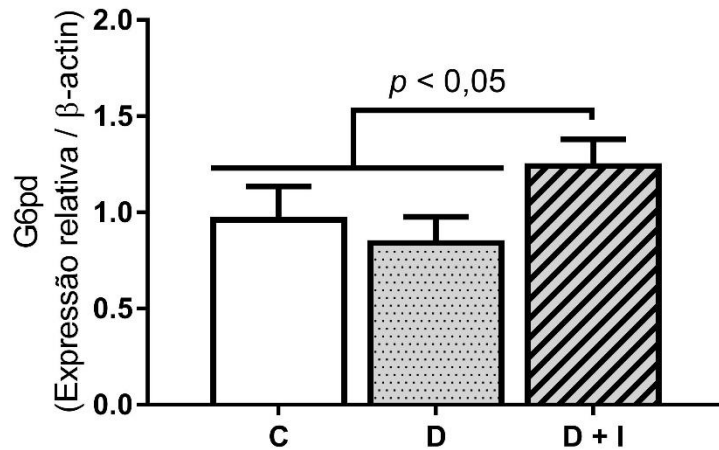
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na quantificação total da enzima glicogênio fosforilase (Figura 5.27) nos animais entre os grupos deste estudo ( $p > 0,05$ ).

### 5.3.7 Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Figura 5.28 – Expressão relativa de mRNA de glicose-6-fosfato desidrogenase

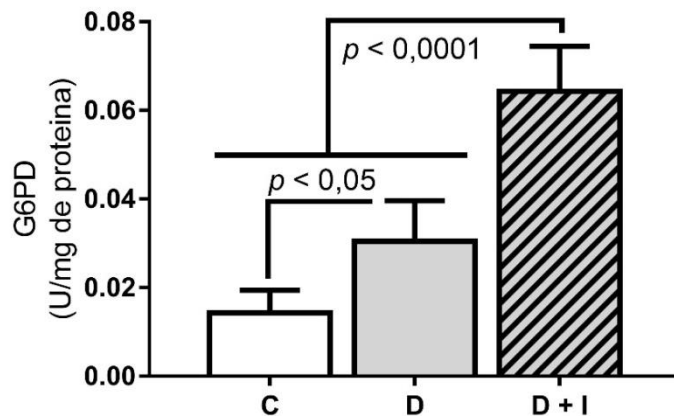


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase entre os grupos C e D ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.28 ). A administração de insulina causou um aumento na expressão desta enzima, a qual foi significativamente maior que nos animais do C e D ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.28 ).

Figura 5.29 – Atividade enzimática de glicose-6-fosfato desidrogenase



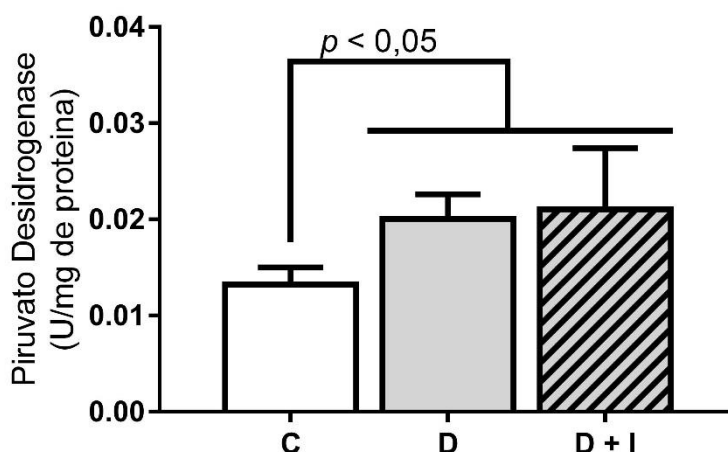
Fonte: O autor.

A atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase foi significativamente maior nos animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina comparados com animais do grupo controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.29 ). A administração de insulina, levou a um aumento na expressão desta enzima, a qual foi significativamente maior que nos animais do grupo controle e diabéticos não tratados ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5.29 ).

### 5.3.8 Piruvato Desidrogenase

O gene da proteína de ligação à diidrolipoil desidrogenase (E3) da piruvato desidrogenase (Pdhx) mitocondrial foi analisada. Entretanto, não foi expressa em nenhum dos grupos estudados.

Figura 5.30 – Atividade enzimática de piruvato desidrogenase



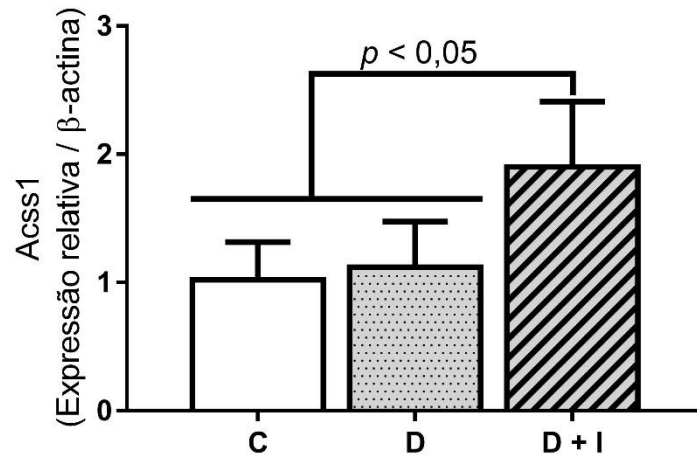
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Para PDH, os resultados (em U/mg de proteína) mostram um aumento significativo na atividade desta enzima nos animais diabéticos e diabéticos tratados comparados com controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.30).

### 5.3.9 Acetil-CoA Sintase

Figura 5.31 – Expressão relativa de mRNA de acetil-CoA sintase

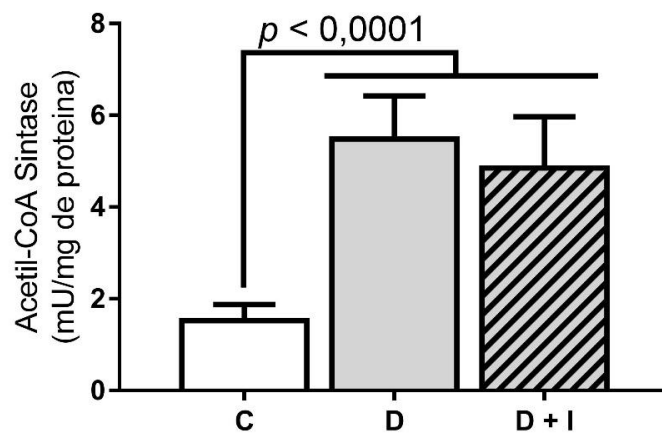


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA da acetil-CoA sintase nos animais diabéticos comparados com controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.31). A administração de insulina levou a um aumento na expressão desta enzima o que foi significativamente maior que nos grupos C e D ( $p < 0,05$ ).

Figura 5.32 – Atividade enzimática de Acetil-CoA sintase



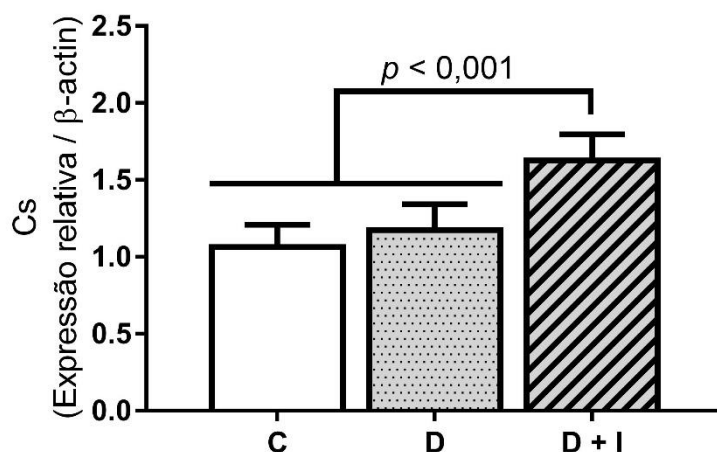
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A atividade da acetil-CoA sintase foi significativamente aumentada em animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina comparados com os controles ( $p < 0,0001$ ), não havendo diferença significativa entre os grupos D e D + I ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.32).

### 5.3.10 Citrato Sintase

Figura 5.33 – Expressão relativa de mRNA de citrato sintase



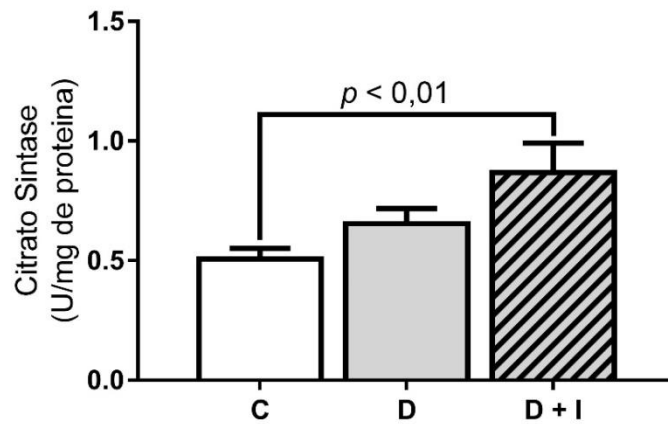
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA da citrato sintase nos animais diabéticos comparados com controle ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.33). A administração de insulina causou aumento na expressão desta enzima o que foi significativamente maior que nos grupos C e D ( $p < 0,001$ ).



Figura 5.34 - Atividade enzimática de citrato sintase



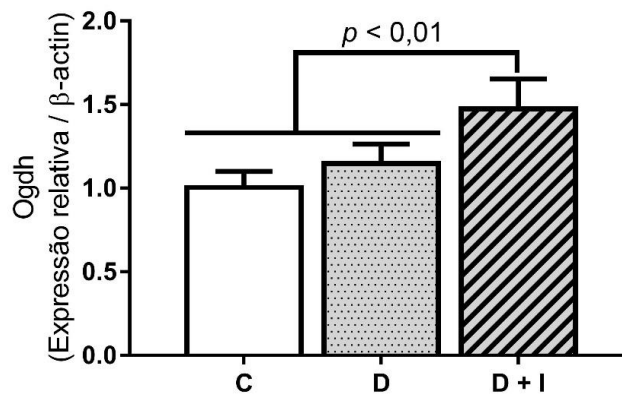
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Os resultados mostram que não houve diferença significativa na atividade desta enzima nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.34). Entretanto, houve um aumento na atividade dessa enzima com administração de insulina comparado com o grupo controle ( $p < 0,01$ ).

### 5.3.11 Alfa-Cetoglutarato Desidrogenase

Figura 5.35 – Expressão relativa de mRNA de alfa-cetoglutarato desidrogenase

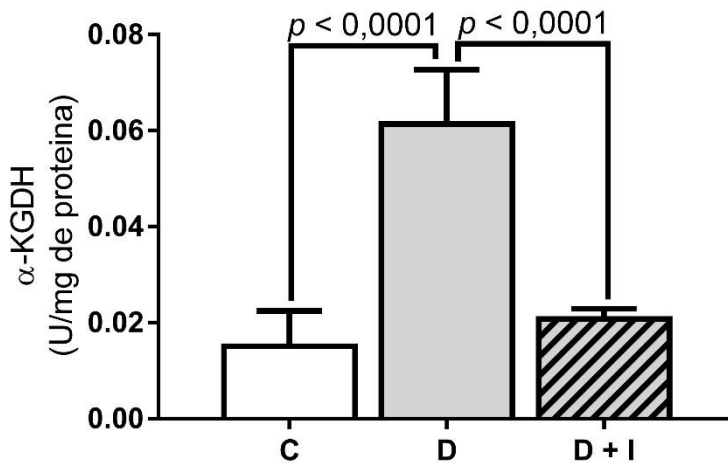


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Para Ogdh, não houve diferença na expressão relativa do mRNA nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.35). A administração de insulina levou a um aumento na expressão desta enzima o que foi significativamente maior que nos animais controles e diabéticos ( $p < 0,01$ ).

Figura 5.36 – Atividade enzimática de  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase

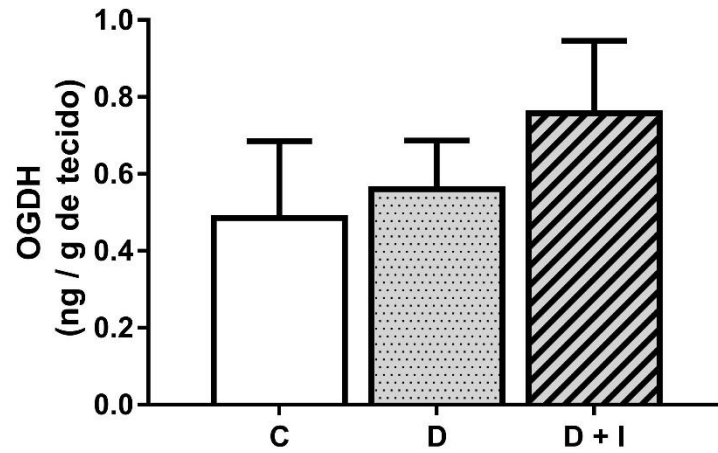


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase foi significativamente aumentada no grupo diabético comparado com o grupo controle ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5.36). A administração de insulina levou a normalização dessa atividade ( $p < 0,0001$ ).

Figura 5.37 – Quantidade total da enzima alfa-cetoglutarato desidrogenase



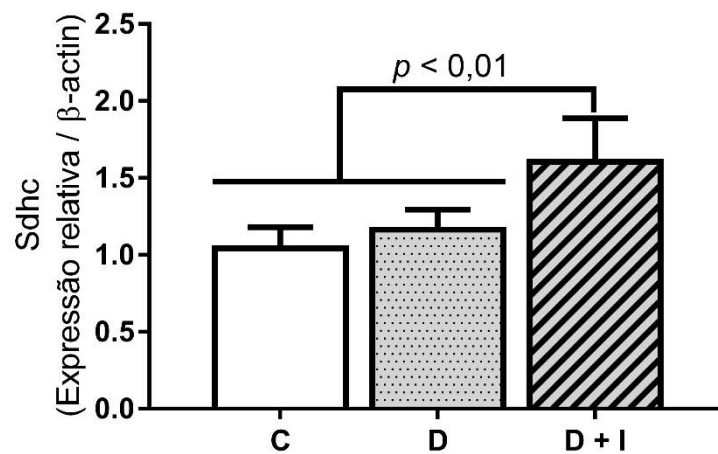
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na quantificação total da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.37).

### 5.3.12 Succinato Desidrogenase

Figura 5.38 – Expressão relativa de mRNA de succinato desidrogenase

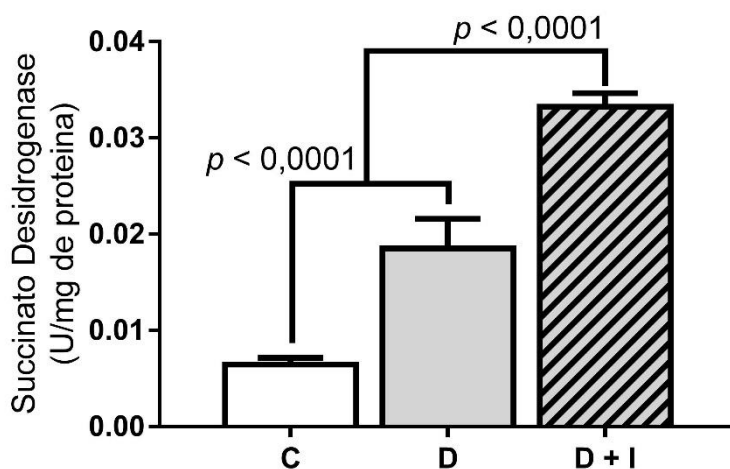


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença na expressão relativa de mRNA da Sdhc nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.38). A administração de insulina levou a um aumento na expressão desta enzima o que foi significativamente maior que nos animais controles e diabéticos ( $p < 0,01$ ) (Figura 5.38).

Figura 5.39 – Atividade enzimática de succinato desidrogenase



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A atividade da succinato desidrogenase foi significativamente aumentada em animais diabéticos comparados com os controles ( $p < 0,0001$ ) (Figura 5.39). A administração de insulina causou um aumento significativo na atividade desta enzima, a qual foi maior que nos animais dos grupos C e D + I ( $p < 0,0001$ ).

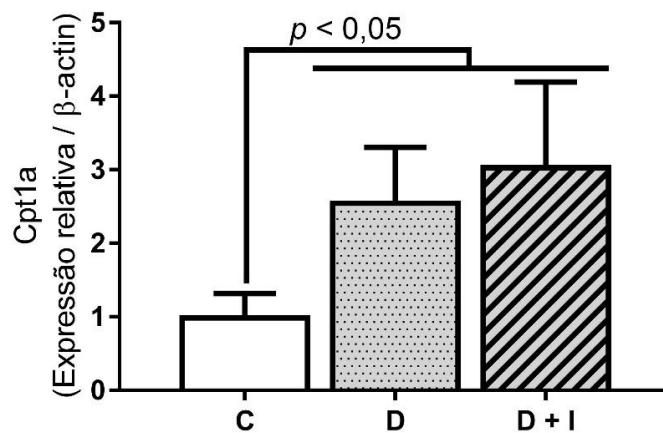
### 5.3.13 Carnitina Palmitoil Transferase 1

A expressão de duas isoformas de carnitina palmitoil transferase foram analisadas no presente estudo: Cpt1a e Cpt1b. Cpt1a predomina em tecidos lipogênicos como o fígado, enquanto Cpt1b predomina em tecidos como coração e

músculo esquelético que têm uma alta capacidade oxidativa de ácidos graxos (Nelson et al., 2008).

Para Cpt1a, houve um aumento de expressão relativa de mRNA nos animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina comparados com os controles ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.40). Não houve diferença significativa entre diabéticos e diabéticos tratados com insulina ( $p > 0,05$ ).

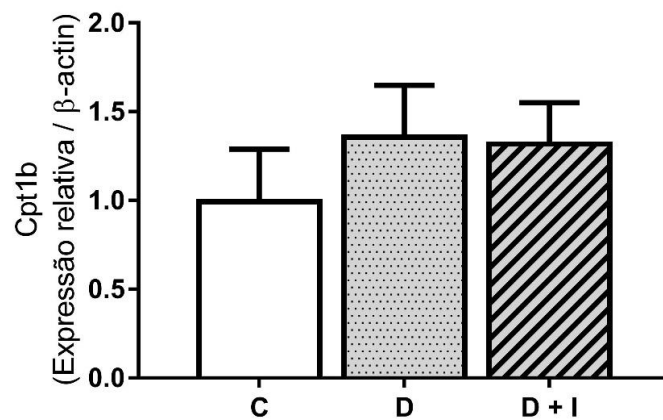
Figura 5.40 – Expressão relativa de mRNA de carnitina palmitoil transferase 1A



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Figura 5.41 – Expressão relativa de mRNA de carnitina palmitoil transferase 1B

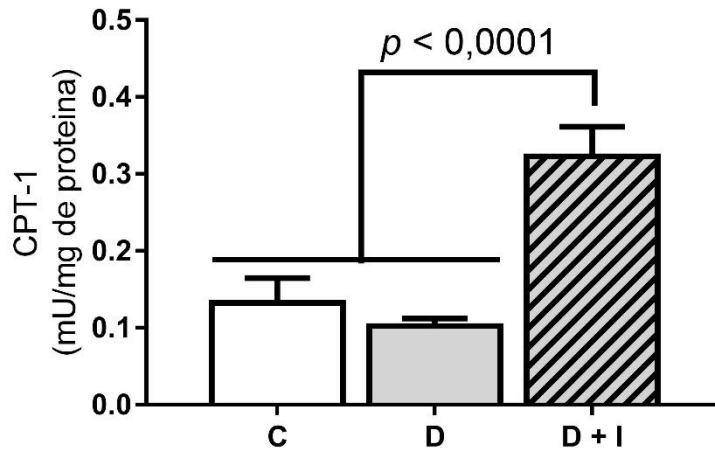


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença significativa na expressão relativa de mRNA de carnitina palmitoil transferase 1B os grupos estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.41).

Figura 5.42 – Atividade enzimática da Carnitina Palmitoil Transferase 1



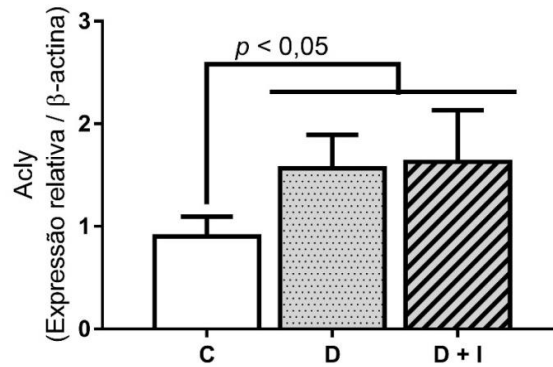
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença significativa na atividade de carnitina palmitoil transferase 1 os grupos C e D ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.42). Entretanto, um aumento significativo na atividade desta enzima foi observado com a administração de insulina ( $p > 0,0001$ ).

### 5.3.14 ATP-citrato Liase

Figura 5.43 – Expressão relativa de mRNA da ATP-citrato Liase

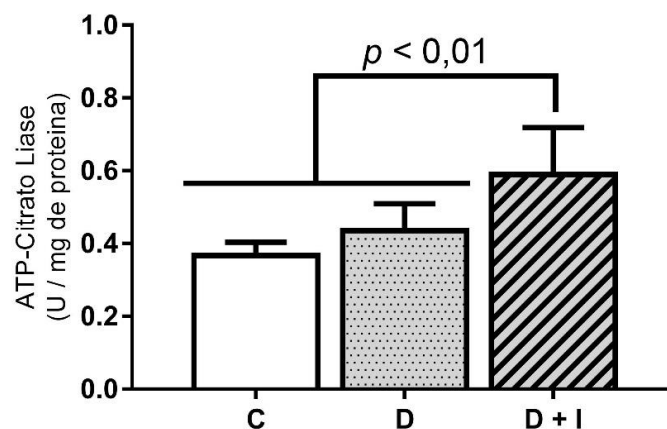


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A figura 5.43 mostra que a indução do diabetes por STZ aumentou significativamente a expressão relativa do mRNA da ATP-citrato Liase nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença significativa entre diabéticos tratados ou não com insulina ( $p > 0,05$ ).

Figura 5.44 – Atividade enzimática da ATP-citrato Liase



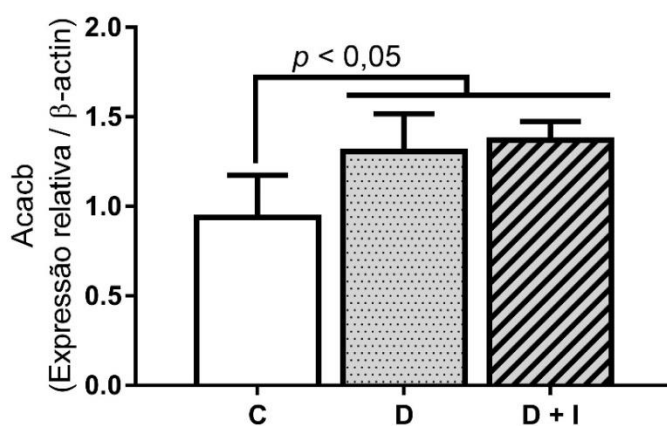
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A figura 5.44 mostra que a indução do DM por STZ não alterou a atividade da ATP-citrato Liase ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a administração de insulina nos ratos diabéticos levou a aumento significativo da atividade desta enzima em comparação com o grupo controle ( $p < 0,01$ ).

#### 5.3.14.1 Acetil-CoA Carboxilase

Figura 5.45 – Expressão relativa de mRNA de Acetil-CoA Carboxilase Beta



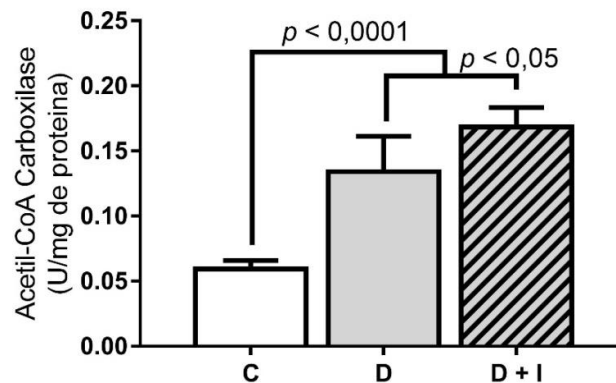
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A figura 5.45 mostra que a indução do diabetes aumentou significativamente a expressão relativa do mRNA da Acacb nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença entre diabéticos tratados ou não com insulina ( $p > 0,05$ ).



Figura 5.46 – Atividade enzimática de Acetil-CoA carboxilase



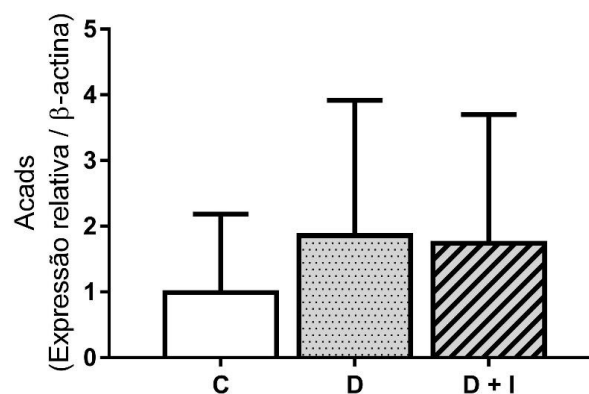
Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

A figura 5.46 mostra que a indução do diabetes aumentou significativamente a atividade da acetil-CoA Carboxilase nos animais diabéticos comparados com os controles ( $p < 0,0001$ ). Ainda, o tratamento com insulina aumentou a atividade desta enzima ( $p > 0,05$ ).

### 5.3.15 Acetil-CoA Desidrogenase

Figura 5.47 – Expressão relativa de mRNA de Acil-CoA Desidrogenase

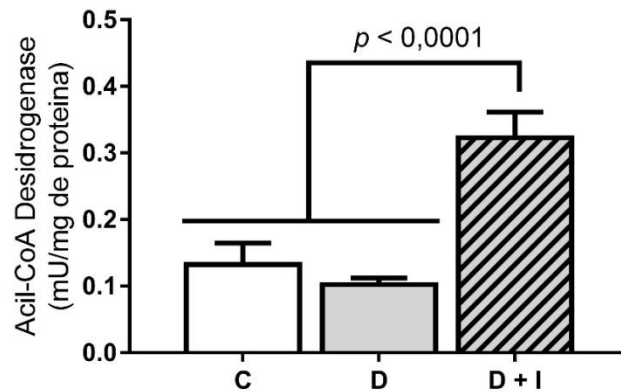


Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

Fonte: O autor.

Não houve diferença significativa na expressão relativa de mRNA de Acil-CoA desidrogenase entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ) (Figura 5.47).

Figura 5.48 – Atividade enzimática de Acetil-CoA desidrogenase



Legenda: C = controle; D = Diabético; D + I = Diabético tratado com insulina por 6 dias. One-way ANOVA com teste de Tukey ( $\alpha = 5\%$ ) foi usado para comparação entre os grupos.

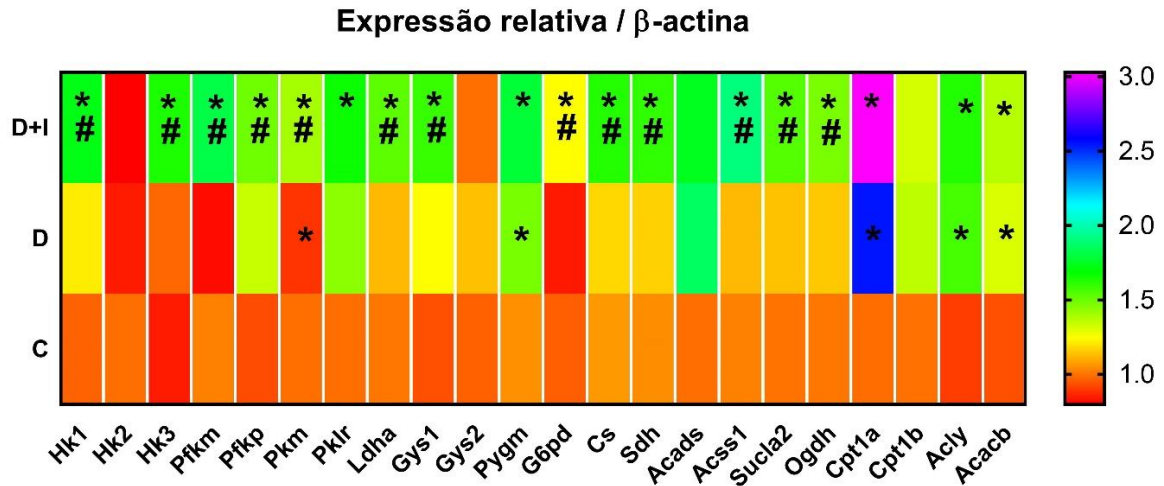
Fonte: O autor.

A figura 5.48 mostra que não houve diferença significativa na atividade de Acil-CoA desidrogenase no grupo diabético comparado com o controle ( $p > 0,05$ ). Com a administração de insulina houve um aumento significativo da atividade desta enzima ( $p < 0,0001$ ).

## 5.4 REPRESENTAÇÃO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS

### 5.4.1 Expressão Gênica

Figura 5.49 – Mapa de calor que representa os resultados gerais da expressão gênica de enzimas dos alvos do metabolismo energético nas glândulas salivares submandibulares dos animais controle (C), diabéticos (D) e diabéticos tratados com insulina (D + I)



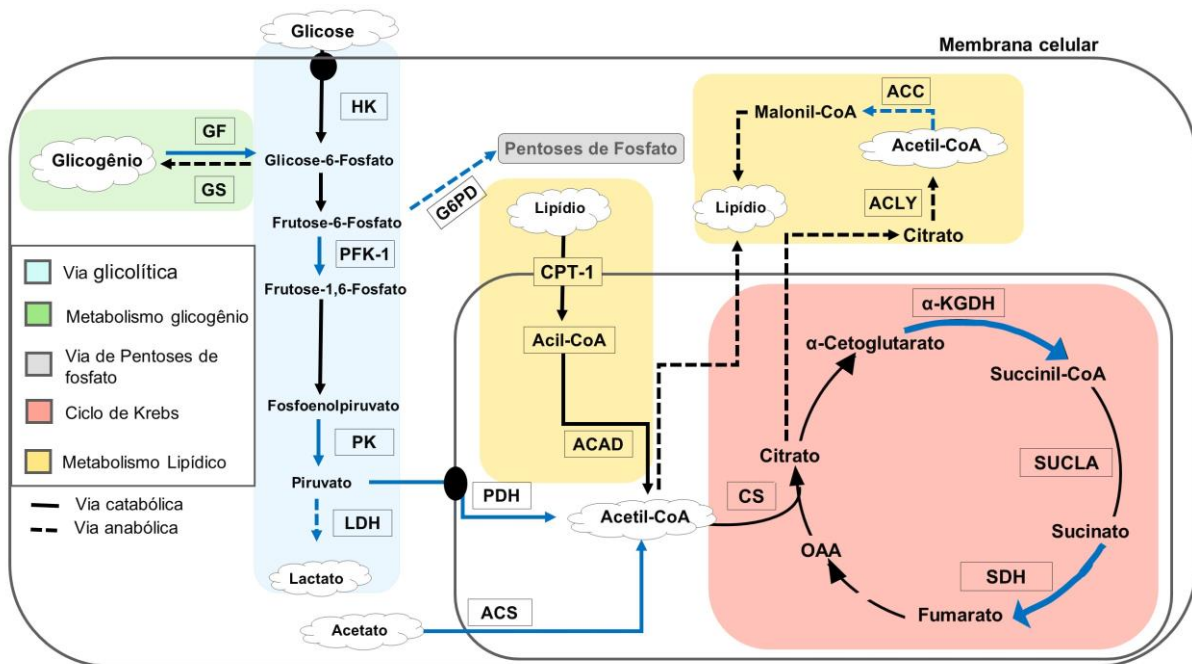
Cada valor representa a média  $\pm$  desvio padrão dos experimentos realizados em duplicata ( $n = 4$ ; One-way ANOVA com post-hoc de Tukey). Asterisco indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). O jogo da velha representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo diabético ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

Os dados apresentados nos mostram que o DM aumentou significativamente a expressão de Pkm, Pygm, Cpt1a, Acly e Acacb ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.49). Com exceção de Hk2, Gys2, Acads e Cpt1b nos quais não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), a administração de Insulina aumentou a expressão das enzimas estudadas ( $p < 0,05$ ).

## 5.4.2 Atividade enzimática

Figura 5.50 – Representação esquemática das vias metabólicas estudadas nos animais diabéticos comparados com controle

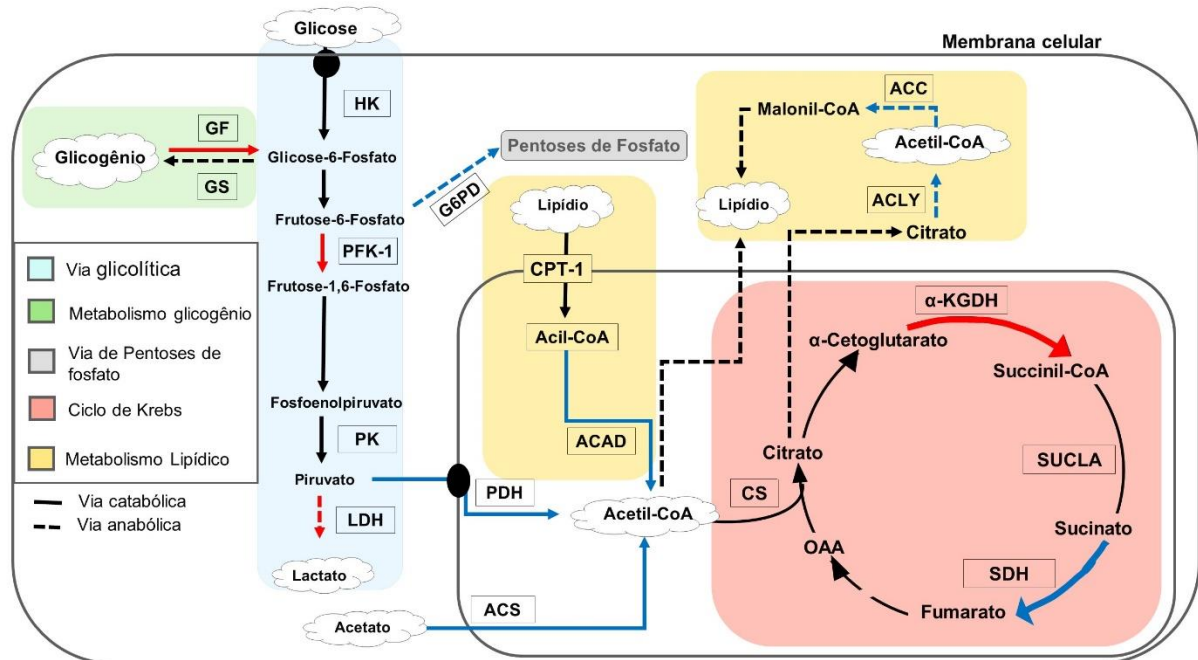


As linhas azuis indicam diferença estatisticamente significativa quando a respectiva atividade enzimática é aumentada ( $p < 0,05$ ).  $\alpha$ -KGDH = alfa-cetogluturato desidrogenase; ACAD = Acetil-CoA Desidrogenase; ACC = Acetil-CoA Carboxilase; ACS = acetil-CoA sintase; ACL = ATP Citrate Lyase; CPT-1 = Carinitina Palmitoiltransferase 1; CS = Citrato Sintase; GF = Fosforilase de Glicogênio; GS = Glicogênio Sintase; HK = hexoquinase; LDH = Lactato Desidrogenase; PDH = Piruvato Desidrogenase; PFK-1 = Fosfofrutoquinase; PK = Piruvato Quinase; SDH = Succinato Desidrogenase; SUCLA = Succinil-CoA sintetase; G6P = Glicose 6-fosfato, F6P = Frutose-6-fosfato, PEP = fosfoenolpiruvato e F1,6P = Frutose 1,6-bifosfato.

Fonte: O autor.

A figura 5.50 uma representação esquemática das vias metabólicas estudadas nos animais diabéticos quando comparados com o grupo controle. Os resultados mostram que o diabetes leva à síntese *de novo* de ácidos graxos na glândula SM e ao consumo de acetato.

Figura 5.51 – Representação esquemática das vias metabólicas estudadas nos animais diabéticos tratados com insulina em relação aos diabéticos não tratados



As linhas azuis indicam diferença estatisticamente significativa quando a respectiva atividade enzimática é aumentada ( $p < 0,05$ ). As linhas vermelhas indicam diferença estatisticamente significativa quando a respectiva atividade enzimática é diminuída ( $p < 0,05$ ).  $\alpha$ -KGDH = alfa-cetoglutarato desidrogenase; ACAD = Acetil-CoA Desidrogenase; ACC = Acetil-CoA Carboxilase; ACS = acetil-CoA sintase; ACL = ATP Citrate Lyase; CPT-1 = Carinitina Palmitoiltransferase 1; CS = Citrato Sintase; GF = Fosforilase de Glicogênio; GS = Glicogênio Sintase; HK = hexoquinase; LDH = Lactato Desidrogenase; PDH = Piruvato Desidrogenase; PFK-1 = Fosfofrutoquinase; PK = Piruvato Quinase; SDH = Succinato Desidrogenase; SUCLA = Succinil-CoA sintetase; G6P = Glicose 6-fosfato, F6P = Frutose-6-fosfato, PEP = fosfoenolpiruvato e F1,6P = Frutose 1,6-bifosfato.

Fonte: O autor.

A figura 5.51 uma representação esquemática das vias metabólicas estudadas nos animais diabéticos tratados com insulina quando comparados com diabéticos não tratados. Quando tratados com insulina, os estoques de glicogênio são repostos e há um aumento na atividade de G6PD, dos níveis de NADPH e de síntese e degradação lipídica.



## 6 DISCUSSÃO

Pesquisas em animais tem permitido o entendimento das mudanças salivares e metabólicas encontradas na disfunção glandular decorrente do DM (Nicolau; Sasaki, 1976; Pedroso et al., 1976; Nicolau; Sasaki, 1983; Nicolau et al., 2003; Nicolau et al., 2005; Nogueira et al., 2005b; Nicolau et al., 2006; Leite; Nicolau, 2009; Nicolau et al., 2009; Simões et al., 2009; Nogueira; Carvalho, 2017; Ibuki et al., 2020; Souza et al., 2021). Um dos modelos experimentais adotados é o diabetes induzido por estreptozotocina. Nele, a dose do medicamento é aplicada no animal levando à destruição das células  $\beta$  pancreáticas responsáveis pela produção de insulina. Neste estudo, os dados mostraram que os animais desenvolveram estado hiperglicêmico e também sintomas apresentados pelos pacientes diabéticos como perda de massa corporal, polidipsia e polifagia.

Os resultados mostram uma diminuição do conteúdo de proteína total nas glândulas SM dos animais diabéticos, o que foi normalizado pela administração de insulina. Essa diminuição na concentração de proteína total nas glândulas SM já havia sido demonstrada em um estudo prévio (Ibuki et al., 2020). O tratamento com insulina também se mostrou capaz de aumentar a concentração total de proteína em tecido adiposo de ratos diabéticos induzidos por STZ (Chang; Rothrock, 1977).

Uma vez que o metabolismo das proteínas é sensível à ação da insulina (Nair et al., 1983), o aumento na quantidade de proteína total observado no grupo diabético tratado com insulina pode ter sido causado pelo estímulo da síntese proteica por este hormônio. Sabe-se que a insulina é capaz de regular enzimas do metabolismo da glicose alterando a transcrição, tradução ou atividade, aumentando o fluxo glicolítico, o que já foi observado no músculo esquelético (Frank; Fromm, 1986) e em glândulas submandibulares de ratos diabéticos tratados com insulina (Murakami, 1974). Assim, o aumento na expressão das enzimas estudadas pode ter sido causado pelo estímulo a síntese proteica causada pela insulina.

A via glicolítica está localizada no citosol e consiste em uma sequência de dez etapas catalisadas por 22 enzimas diferentes, algumas delas isoenzimas. O produto da glicólise (piruvato) serve como material de partida para o ciclo de Krebs que

ocorre na mitocôndria. O ciclo de Krebs compreende oito etapas distintas envolvendo 20 enzimas, várias das quais formam complexos de várias subunidades. A hexoquinase é a enzima inicial na via glicolítica e catalisa a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato. É uma das enzimas limitantes da taxa de glicólise, sendo que a glicose 6-fosfato é um ponto de ramificação que leva ao metabolismo do glicogênio e via das pentoses-fosfato (Nelson et al., 2008). A segunda etapa da glicólise envolve a conversão de glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato. E em seguida, há a conversão de frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato, reação esta que é importante para controlar o fluxo glicolítico e é catalisada pela PFK-1 (Nelson et al., 2008).

Neste estudo, três mRNAs de hexoquinase foram expressos nas glândulas submandibulares (Hk1, Hk2 e Hk3). O DM não alterou os níveis dos mRNAs e a atividade da hexoquinase. O tratamento com insulina aumentou a expressão dos mRNAs de Hk1 e Hk3, bem como a atividade total de hexoquinase nas glândulas SM. Nas glândulas submandibulares, mRNAs de fosfofrutoquinase-1 tanto de plaquetas (Pfkp) quanto músculo (Pfkm) foram expressas. O tratamento com insulina causou um aumento acentuado na expressão das duas isoformas de Fosfofrutoquinase-1. Neste estudo, a atividade total de fosfofrutoquinase-1 foi diminuída pela administração de insulina. O metabolismo do glicogênio é regulado por duas enzimas: glicogênio fosforilase e glicogênio sintase. A glicogênio fosforilase catalisa a etapa limitante da glicogenólise, liberando glicose-1-fosfato. Esta enzima é regulada por fosforilação reversível e efeitos alostéricos. Por outro lado, a glicogênio sintase catalisa a conversão de glicose-1-fosfato em glicogênio (Nelson et al., 2008). Neste estudo, foi observado para enzima glicogênio fosforilase um aumento de sua atividade nos animais diabéticos, a qual foi diminuída pela administração de insulina. Nenhuma mudança na atividade glicogênio sintase foi observada entre os grupos.

Conforme observado aqui, em condições onde os níveis de insulina são deficientes como no DM, há um aumento na glicogenólise e, portanto, um aumento nos intermediários glicolíticos, incluindo frutose 2,6-bifosfato, que pode levar a um aumento na glicólise, produção de lactato pela lactato desidrogenase (Hue, 2001; Edgerton et al., 2002). Ainda, o hormônio insulina pode inibir a glicogênio fosforilase (Ortmeyer et al., 1997) sem reduzir fluxo gliconeogênico (Edgerton et al., 2002). Curiosamente, o tratamento com insulina aumentou o mRNA e a atividade da G6PD. Isso possivelmente mostra uma tentativa de remodelação metabólica para a



recuperação funcional da glândula SM, aumentando a produção de bases nitrogenadas através da via das pentoses-fosfato.

A reação final da glicólise é catalisada pela piruvato quinase, que converte fosfoenolpiruvato em piruvato (Nelson et al., 2008) e é amplamente regulado no nível de sua transcrição. Sabe-se que a expressão da piruvato quinase aumenta em resposta à glicose e à insulina (Uyeda, 2013), o que está em conformidade com o observado neste estudo para mRNAs de Pkm e Pklr. O aumento da atividade de piruvato quinase e lactato desidrogenase no diabetes pode ser causado por deficiência de insulina, com redução da oxidação do piruvato, levando a uma situação que tende a acumular lactato (Chang; Rothrock, 1977; Miyanaga et al., 1982). A observação de que o diabetes e o tratamento com insulina induzem uma mudança na atividade da lactato desidrogenase sugere que isto seria para evitar o acúmulo excessivo de lactato nas glândulas submandibulares.

A piruvato desidrogenase catalisa a conversão do piruvato em acetil-CoA e é um ponto de convergência na regulação entre o metabolismo da glicose e a oxidação dos ácidos graxos (Nelson et al., 2008). A citrato sintase é a primeira enzima do ciclo de Krebs, determinando o fluxo deste ciclo (Nelson et al., 2008; Hue et al., 2016). Neste estudo, mesmo embora não tenha sido detectado a expressão da piruvato desidrogenase, a atividade desta enzima aumentou nos animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina. A atividade da citrato sintase aumentou com a administração de insulina. O aumento na expressão e atividade dessas enzimas possivelmente pode estar relacionado a um maior fluxo glicolítico e ao uso de ácidos graxos como substrato metabólico visto que os resultados deste estudo também mostram um aumento no mRNA de carnitina palmitoil transferase 1 e na atividade da acil-CoA desidrogenase, responsáveis pela mobilização e oxidação dos ácidos graxos, respectivamente. Curiosamente, um aumento acentuado no mRNA e na atividade da acetil-CoA sintase foi observado nos animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina. A enzima acetil-CoA sintase combina acetato e CoA para formar acetil-CoA, que pode ser utilizada na produção de ácidos graxos ou para gerar energia no ciclo de Krebs. Neste sentido, inicialmente, o tratamento com insulina em um animal diabético não somente estimularia a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo, mas também aceleraria a sua oxidação bem como o uso do acetato como fonte de energia.

A observação de que a taxa de produção de acetil-CoA da via glicolítica, metabolismo do acetato e oxidação de ácidos graxos nas glândulas submandibulares poderia exceder a capacidade do ciclo de Krebs pode levar a uma situação de síntese *de novo* de ácidos graxos. De fato, observamos que níveis de mRNA e de atividade de ATP-citrato liase e acetil-CoA carboxilase, enzimas-chave na via de síntese *de novo* de ácido graxos, foram aumentados nos animais diabéticos e diabéticos tratados com insulina, respectivamente. A síntese de ácidos graxos utiliza NADPH, que é gerado principalmente por meio da via pentoses-fosfato (Souza et al., 2021).

O aumento da atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase neste estudo pode ter levado à maior geração de NADPH para ser usado na síntese de lipídios. Interessantemente, aumento do conteúdo lipídico nas glândulas salivares maiores tem sido observado em animais diabéticos (Hand; Weiss, 1984; Anderson; Garrett, 1986; Morris et al., 1992; Simões et al., 2009; Maciejczyk et al., 2018), o que poderia ser considerado uma manifestação clínica desta doença (Matczuk et al., 2016) visto que os indivíduos com diabetes frequentemente apresentam dislipidemia típica. Essas alterações lipídicas não poderiam ser compreendidas apenas uma consequência direta do DM, mas também devido a distúrbios no metabolismo da glicose (Parhofer, 2015). Além disso, a lipogênese, síntese de lipídeos, é estimulada pela insulina, que provavelmente é o fator hormonal mais importante nesta via metabólica (Kersten, 2001; Flannery et al., 2012). O acúmulo de lipídios em animais diabéticos parece ser devido à diminuição do seu uso para secreção de proteínas, ocasionada pela redução da capacidade secretora das membranas decorrente da alteração na composição dos ácidos graxos (Morris et al., 1992).

A  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase é uma enzima altamente regulada que pode determinar o fluxo metabólico através do ciclo de Krebs, catalisando a conversão de  $\alpha$ -cetoglutarato em succinil-CoA, produzindo NADH e entregando elétrons diretamente para a cadeia respiratória (Nelson et al., 2008; Ciccarone et al., 2019).

Os resultados mostram um aumento na expressão da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase nos animais diabéticos tratados com insulina. A atividade desta enzima, que estava aumentada nos ratos diabéticos foi normalizada pelo tratamento com insulina. Curiosamente, a quantificação da enzima não mostrou diferença entre

os grupos, o que poderia ser possivelmente devido à uma regulação alostérica dessa enzima. Ainda, a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase pode ser considerada um alvo precoce do estresse oxidativo (Tretter; Adam-Vizi, 2000) por gerar peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, portanto, ser uma fonte de espécies reativas de oxigênio (Tretter; Adam-Vizi, 2004). A reação catalisada pela succinil-CoA sintetase normalmente favorece a conversão de succinil-CoA em succinato. Esta via de fornecimento de energia torna-se importante em condições anaeróbicas quando a geração de ATP por fosforilação oxidativa é inibida (Nelson et al., 2008; Russell; Taegtmeyer, 2013; Kumar; Dubey, 2019).

Os resultados mostram que houve aumento da expressão e da atividade da succinil-CoA sintetase nos animais diabéticos tratados com insulina. Além disso, a atividade de succinato desidrogenase foi aumentada nos animais diabéticos e diabéticos tratados. Embora a succinato desidrogenase possa exercer um efeito na mediação da produção de espécies reativas de oxigênio e na disfunção mitocondrial, sua influência no diabetes é desconhecida.

Estudos mostram que as principais alterações decorrentes do estado hiperglicêmico no diabetes são causadas pelo estresse oxidativo (Forbes et al., 2003; Maritim et al., 2003; Rolo; Palmeira, 2006; Al-Rawi, 2011). Em estudos anteriores já foi observada a presença de estresse e dano oxidativo nas glândulas submandibulares (Nogueira et al., 2005a; Ibuki et al., 2010; Ibuki et al., 2020; Souza et al., 2021). Assim, é possível que haja uma relação entre o aumento da atividade de  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e succinato desidrogenase, o estado hiperglicêmico no diabetes e a produção de espécies reativas de oxigênio.



## **7 CONCLUSÃO**

O diabetes alterou a expressão e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético das glândulas submandibulares, levando à síntese de ácidos graxos e consumo de glicogênio e acetato.

A administração de insulina aumentou o fluxo na via pentoses-fosfato e a degradação e síntese lipídica nas glândulas submandibulares.

Em conjunto, os dados sugerem que as alterações metabólicas presentes na glândula submandibular devido ao DM são principalmente insulino-dependentes e reversíveis.



**REFERÊNCIAS<sup>1</sup>**

Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diab Vasc Dis Res*. 2011 Jan;8(1):22-8. doi: 10.1177/1479164110390243.

Anderson LC, Garrett JR. Lipid accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 1986;31(7):469-75. doi: 10.1016/0003-9969(86)90021-x.

Anrep GV, Cannan RK. The concentration of lactic acid in the blood in experimental alkalaemia and acidaemia. *J Physiol*. 1923 Dec 28;58(2-3):244-58. doi: 10.1113/jphysiol.1923.sp002121.

Anrep GV, Cannan RK. The metabolism of the salivary glands: II. The blood sugar metabolism of the submaxillary gland. *J Physiol*. 1922a May 16;56(3-4):248-58. doi: 10.1113/jphysiol.1922.sp002006.

Anrep GV, Cannan RK. The metabolism of the salivary glands: III. The blood sugar metabolism of the submaxillary gland. *J Physiol*. 1922b Dec 22;57(1-2):1-6. doi: 10.1113/jphysiol.1922.sp002035.

Antranikian G, Herzberg C, Gottschalk G. Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*. *J Bacteriol*. 1982 Dec;152(3):1284-7. doi: 10.1128/jb.152.3.1284-1287.1982.

Bergmeyer HU, Gawehn K. *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie; New York, N.Y.: Academic Press; 1974.

Cetik S, Hupkens E, Malaisse WJ, Sener A, Popescu JR. Expression and localization of glucose transporters in rodent submandibular salivary glands. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(4):1149-61. doi: 10.1159/000358684.

Cha S, Parks RE Jr. Succinic Thiokinase. I. Purification of the enzyme from pig heart. *J Biol Chem*. 1964 Jun;239:1961-7.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

Chang AY, Rothrock D. The effect of diabetes and insulin on adipose lactate dehydrogenase isozymes. *Can J Biochem*. 1977 Jan;55(1):113-6. doi: 10.1139/o77-018.

Chiang PK. Glycogen metabolism in the snail, *Biomphalaria glabrata*. *Comp Biochem Physiol B*. 1977;58(1):9-12. doi: 10.1016/0305-0491(77)90117-1.

Ciccarone F, Di Leo L, Ciriolo MR. TCA cycle aberrations and cancer. In: Boffetta P, Hainaut P, editors. *Encyclopedia of cancer*. 3rd ed. Oxford: Academic Press; 2019. p. 429-36.

Cutando A, Gómez-Moreno G, Villalba J, Ferrera MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Relationship between salivary melatonin levels and periodontal status in diabetic patients. *J Pineal Res*. 2003 Nov;35(4):239-44. doi: 10.1034/j.1600-079x.2003.00075.x.

Delporte C, Steinfeld S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Aug;1758(8):1061-70. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.01.022.

Deutsch W, Raper HS. Respiration and functional activity. *J Physiol*. 1936 Aug 19;87(3):275-86. doi: 10.1113/jphysiol.1936.sp003405.

Dodds MW, Johnson DA, Yeh CK. Health benefits of saliva: a review. *J Dent*. 2005 Mar;33(3):223-33. doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.

Edgar WM, Dawes C, O'Mullane DM, editors. *Saliva and oral health*. Duns Tew: Stephen Hancocks; 2012.

Edgar WM, Dawes C, O'Mullane DM, editors. *Saliva and oral health*. London: British Dental Association; 2004.

Edgerton DS, Cardin S, Pan C, Neal D, Farmer B, Converse M, et al. Effects of insulin deficiency or excess on hepatic gluconeogenic flux during glycogenolytic inhibition in the conscious dog. *Diabetes*. 2002 Nov;51(11):3151-62. doi: 10.2337/diabetes.51.11.3151.

English JA. Enzymatic activity of radiated and normal salivary gland tissues. *Am J Physiol*. 1955 Dec;183(3):463-74. doi: 10.1152/ajplegacy.1955.183.3.463.



Flannery C, Dufour S, Rabøl R, Shulman GI, Petersen KF. Skeletal muscle insulin resistance promotes increased hepatic de novo lipogenesis, hyperlipidemia, and hepatic steatosis in the elderly. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2711-7. doi: 10.2337/db12-0206.

Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8 Suppl 3):S254-8. doi: 10.1097/01.asn.0000077413.41276.17.

Frank SK, Fromm HJ. Effect of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the synthesis of hexokinase II in the skeletal muscle of the rat. *Arch Biochem Biophys*. 1986 Aug 15;249(1):61-9. doi: 10.1016/0003-9861(86)90560-6.

Glock GE, McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem J*. 1953 Oct;55(3):400-8. doi: 10.1042/bj0550400.

Goldman J, Rosales F, Villavicencio M, Guerra R. Pathways of glucose metabolism in rat submaxillary gland. *Biochim Biophys Acta*. 1964 Feb 10;82:303-12. doi: 10.1016/0304-4165(64)90301-0.

Hand AR, Weiss RE. Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest*. 1984 Oct;51(4):429-40.

Hatefi Y, Stiggall DL. Preparation and properties of succinate: ubiquinone oxidoreductase (complex II). In: Fleischer S, Packer L, editors. *Methods in enzymology*. New York; London: Academic Press; 1978. Vol. 53, p. 21-7.

Hinman LM, Blass JP. An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crude tissue homogenates. *J Biol Chem*. 1981 Jul 10;256(13):6583-6.

Horak H, Pritchard ET. Fatty acid oxidation in mitochondria isolated from rat submandibular salivary glands. *Biochim Biophys Acta*. 1971 Nov 2;253(1):12-23. doi: 10.1016/0005-2728(71)90228-3.

Hue L. Regulation of gluconeogenesis in liver: In: Jefferson LS, Cherrington AD, Goodman HM, American Physiological Society. *Handbook of physiology: a critical, comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts: Section 7: The Endocrine System*. Vol. II: The endocrine pancreas and regulation of metabolism. Oxford: Oxford University Press; 2001.

Hue L, Beauloye C, Bertrand L. Principles in the regulation of cardiac metabolism. In: Schwarzer M, Doenst T, editors. *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism*. Boston: Academic Press, 2016. Chapter 5, p. 57-71.

Hue L, Bontemps F, Hers H. The effects of glucose and of potassium ions on the interconversion of the two forms of glycogen phosphorylase and of glycogen synthetase in isolated rat liver preparations. *Biochem J*. 1975 Oct;152(1):105-14. doi: 10.1042/bj1520105.

Ibuki FK, Bergamaschi CT, da Silva Pedrosa M, Nogueira FN. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*. 2020 Aug;116:104765. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104765.

Ibuki FK, Simões A, Nogueira FN. Antioxidant enzymatic defense in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats: a temporal study. *Cell Biochem Funct*. 2010 Aug;28(6):503-8. doi: 10.1002/cbf.1683.

Jurysta C, Nicaise C, Cetik S, Louchami K, Malaisse WJ, Sener A. Glucose transport by acinar cells in rat parotid glands. *Cell Physiol Biochem*. 2012;29(3-4):325-30. doi: 10.1159/000338487.

Jurysta C, Nicaise C, Giroix M.-H, Cetik S, Malaisse WJ, Sener A. Comparison of GLUT1, GLUT2, GLUT4 and SGLT1 mRNA expression in the salivary glands and six other organs of control, streptozotocin-induced and Goto-Kakizaki diabetic rats. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(1):37-43. doi: 10.1159/000343347.

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001 Apr;2(4):282-6. doi: 10.1093/embo-reports/kve071.

Kumar P, Dubey KK. Citric acid cycle regulation: back bone for secondary metabolite production. In: Gupta VK, Pandey A, editors. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Amsterdam: Elsevier; 2019. Chapter 13, p. 165-81.

Lai JC, Cooper AJ. Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J Neurochem*. 1986 Nov;47(5):1376-86. doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb00768.x.

Leite MF, Nicolau J. Sodium tungstate on some biochemical parameters of the parotid salivary gland of streptozotocin-induced diabetic rats: a short-term study. *Biol Trace Elem Res*. 2009 Feb;127(2):154-63. doi: 10.1007/s12011-008-8233-5.

Llorente P, Marco R, Sols A. Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads. *Eur J Biochem*. 1970 Mar 1;13(1):45-54. doi: 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00897.x.

Lowry OH, Lopez JA. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J Biol Chem*. 1946 Mar;162:421-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951 Nov;193(1):265-75.

Maciejczyk M, Matczuk J, Żendzian-Piotrowska M, Niklińska W, Fejfer K, Szarmach I, et al. Eight-Week Consumption of High-Sucrose Diet Has a Pro-Oxidant Effect and Alters the Function of the Salivary Glands of Rats. *Nutrients*. 2018 Oct 17;10(10):1530. doi: 10.3390/nu10101530.

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.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24-38. doi: 10.1002/jbt.10058.

Masi I, Pocchiari F, Szymczyk T. Metabolismo del glucosio nella ghiandola sottomascellare di ratto in vitro. Effetto dell'insulina [In vitro glucose metabolism in the rat submaxillary gland. Effect of insulin]. *Ann Ist Super Sanita*. 1966;2(2):287-95.

Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF, et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem*. 2004 Jun;261(1-2):137-42. doi: 10.1023/b:mcbi.0000028748.40917.6f.

Matczuk J, Zalewska A, Łukaszuk B, Garbowska M, Chabowski A, Żendzian-Piotrowska M, et al. Effect of streptozotocin-induced diabetes on lipids metabolism in the salivary glands. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2016 Nov;126:9-15. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2016.08.003.

Matczuk J, Zalewska A, Łukaszuk B, Knaś M, Maciejczyk M, Garbowska M, et al. Insulin resistance and obesity affect lipid profile in the salivary glands. *J Diabetes Res.* 2016;2016:8163474. doi: 10.1155/2016/8163474.

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:445-69. doi: 10.1146/annurev.physiol.67.041703.084745.

Miyanaga O, Nagano M, Cottam GL. Effect of insulin on liver pyruvate kinase in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 1982 Sep 25;257(18):10617-23.

Morris PA, Prout RE, Proctor GB, Garrett JR, Anderson LC. Lipid analysis of the major salivary glands in streptozotocin-diabetic rats and the effects of insulin treatment. *Arch Oral Biol.* 1992;37(6):489-94. doi: 10.1016/0003-9969(92)90105-h.

Murakami H. Changes in activities of several enzymes for carbohydrate metabolism in the rat submaxillary gland in response to experimental diabetes and insulin treatment. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1974 Dec;16(4):91-4. doi: 10.2334/josnugd1959.16.91.

Nair KS, Garrow JS, Ford C, Mahler RF, Halliday D. Effect of poor diabetic control and obesity on whole body protein metabolism in man. *Diabetologia.* 1983 Nov;25(5):400-3. doi: 10.1007/BF00282518.

Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry.* [Basingstoke, UK]. Macmillan, 2008.

Nicolau J editor, *Fundamentos de Odontologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. (Crivello Junior O, coordenador. *Fundamentos de bioquímica oral*).

Nicolau J, Ganzerla E, de Souza DN. Glycogen content and activities of enzymes involved in the carbohydrate metabolism of the salivary glands of rats during postnatal development. *Arch Oral Biol.* 2003 Feb;48(2):101-9. doi: 10.1016/s0003-9969(02)00165-6.

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. doi: 10.2334/josnugd.47.111.

Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in the major salivary glands of rats. *Arch Oral Biol.* 1976;21(11):659-61. doi: 10.1016/0003-9969(76)90140-0.

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. doi: 10.1016/0306-3623(83)90174-x.

Nicolau J, Souza DN, Nogueira FN. Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Braz Oral Res.* 2006 Apr-Jun;20(2):108-13. doi: 10.1590/s1806-83242006000200004.

Nicolau J, Souza DN, Simões A. Alteration of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in the homogenate, plasma membrane and microsomes of the salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2009 Apr;27(3):128-34. doi: 10.1002/cbf.1544.

Nogueira FN, Carvalho RA. Metabolic remodeling triggered by salivation and diabetes in major salivary glands. *NMR Biomed.* 2017 Feb;30(2). doi: 10.1002/nbm.3683.

Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta.* 2005a Mar;353(1-2):133-9. doi: 10.1016/j.cccn.2004.11.004.

Nogueira FN, Nicolau J. Influence os streptozotocin-induced diabetes on the activity, distribution and isoenzymes of hexokinase of salivary gland of rats. 2004. In Press.

Nogueira FN, Santos MF, Nicolau J. Influence of streptozotocin-induced diabetes on hexokinase activity of rat salivary glands. *J Physiol Biochem.* 2005b Sep;61(3):421-7. doi: 10.1007/BF03168448.

Ortmeyer HK, Bodkin NL, Hansen BC. Insulin regulates liver glycogen synthase and glycogen phosphorylase activity reciprocally in rhesus monkeys. *Am J Physiol.* 1997 Jan;272(1 Pt 1):E133-8. doi: 10.1152/ajpendo.1997.272.1.E133.

Parhofer KG. Interaction between Glucose and Lipid metabolism: more than diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab J.* 2015 Oct;39(5):353-62. doi: 10.4093/dmj.2015.39.5.353.

Pedroso FI, Leal A, Rosa R, Nicolau J. Metabolism in vitro of the submandibular salivary gland from rats subjected to various nutritional conditions. *Arch Oral Biol.* 1976;21(9):499-502. doi: 10.1016/0003-9969(76)90013-3.

Pritchard ET. Investigation of lipids and lipid metabolism in submandibular salivary gland of the rat. *Arch Oral Biol.* 1967 Dec;12(12):1445-56. doi: 10.1016/0003-9969(67)90181-1.

Proctor GB, Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci.* 2007 Apr 30;133(1):3-18. doi: 10.1016/j.autneu.2006.10.006.

Rocha EM, Lima MHM, Carvalho CR, Saad MJ, Velloso LA. Characterization of the insulin-signaling pathway in lacrimal and salivary glands of rats. *Curr Eye Res.* 2000 Nov;21(5):833-42. doi: 10.1076/ceyr.21.5.833.5535.

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Apr 15;212(2):167-78. doi: 10.1016/j.taap.2006.01.003.

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.

Russell RR, Taegtmeier H. Anaplerosis. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. *Encyclopedia of biological chemistry.* 2nd ed. Waltham: Academic Press; 2013. p. 105-10.

Sanchez LB, Müller M. Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *FEBS Lett.* 1996 Jan 15;378(3):240-4. doi: 10.1016/0014-5793(95)01463-2.

Schuster DP, Duvuuri V. Diabetes mellitus. *Clin Podiatr Med Surg.* 2002 Jan;19(1):79-107. doi: 10.1016/S0891-8422(03)00082-X.

Simões A, de Oliveira E, Campos L, Nicolau J. Ionic and histological studies of salivary glands in rats with diabetes and their glycemic state after laser irradiation. *Photomed Laser Surg.* 2009 Dec;27(6):877-83. doi: 10.1089/pho.2008.2452.

Souza DN, Mendes FM, Nogueira FN, Simões A, Nicolau J. Lithium induces glycogen accumulation in salivary glands of the rat. *Biol Trace Elem Res*. 2016 Feb;169(2):271-8. doi: 10.1007/s12011-015-0434-0.

Souza DN, de Souza EMN, da Silva Pedrosa M, Nogueira FN, Simões A, Nicolau J. Effect of tungstate administration on the lipid peroxidation and antioxidant parameters in salivary glands of STZ-Induced Diabetic Rats. *Biol Trace Elem Res*. 2021 Apr;199(4):1525-33. doi: 10.1007/s12011-020-02273-x.

Stromblad BC. Oxygen consumption of the normal and denervated submaxillary gland in vitro. *Acta Physiol Scand*. 1957 Oct 10;40(2-3):130-45. doi: 10.1111/j.1748-1716.1957.tb01483.x.

Tanabe T, Nakanishi S, Hashimoto T, Ogiwara H, Nikawa J, Numa S. Acetyl-CoA carboxylase from rat liver. *Methods Enzymol*. 1981;71 Pt C:5-16. doi: 10.1016/0076-6879(81)71003-6.

Teeuw WJ, Gerdes VE, Loos BG. Effect of periodontal treatment on glycemic control of diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2010 Feb;33(2):421-7. doi: 10.2337/dc09-1378.

Terroux KG, Sekelj P, Burgen AS. Oxygen consumption and blood flow in the submaxillary gland of the dog. *Can J Biochem Physiol*. 1959 Jan;37(1):5-15.

Tretter L, Adam-Vizi V. Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *J Neurosci*. 2004 Sep 8;24(36):7771-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1842-04.2004.

Tretter L, Adam-Vizi V. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: A key role of [alpha]-ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. *J Neurosci*. 2000 Dec 15;20(24):8972-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-24-08972.2000.

Tucker AS, Miletich I. Salivary glands: development, adaptations and disease. Basel: Karger; 2010.

Uyeda K. Phosphofructokinase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1979;48:193-244. doi: 10.1002/9780470122938.ch4.

Uyeda K. Pyruvate Kinase. In: Lennarz WJ, Lane MD, editors. Encyclopedia of biological chemistry. 2nd ed. Waltham: Academic Press; 2013. p. 719-721.

Uyeda K, Racker E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. VII. Hexokinase and phosphofructokinase. *J Biol Chem.* 1965 Dec;240(12):4682-8.

Vatta MS, Hope SI, Prendes GM, Bianciotti LG, Elverdin JC, Fernandez BE. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2002 Apr;22(2):65-71. doi: 10.1046/j.1474-8673.2002.00243.x.

Verity MA, Turnbull DM. Assay of acyl-CoA dehydrogenase activity in frozen muscle biopsies: application to medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Biochem Med Metab Biol.* 1993 Jun;49(3):351-62. doi: 10.1006/bmmb.1993.1036.

West DW, Chase JF, Tubbs PK. The separation and properties of two forms of carnitine palmitoyltransferase from ox liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971 Mar 5;42(5):912-8. doi: 10.1016/0006-291x(71)90517-1.



## 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: "Efeito do diabete e da insulina na produção e atividade de enzimas chave do metabolismo energético nas glândulas submandibulares de ratos", registrada com o nº **06/2020**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Neves Nogueira, Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, colaboradores: Marlus da Silva Pedrosa, Douglas Nesadal de Sousa, Douglas de Oliveira Amaral, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da FOU SP, 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 24/11/2020.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/06/2020 a 31/07/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico - Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	150 - 200g
Sexo	M
Origem	Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

São Paulo, 24 novembro de 2020.

Profa. Associada Dra. Silvia Vanessa Lourenço  
Coordenadora do CEUA-FOUSP