



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**IDENTIFICAÇÃO DE AGEs NA SALIVA COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO  
DO DIABETES MELLITUS**

**Aluna:** Mariane Yumiko Muraoka

**Orientador:** Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

**UBERLÂNDIA - MG  
2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE AGEs NA SALIVA COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO  
DO DIABETES MELLITUS**

**Aluna:** Mariane Yumiko Muraoka

**Orientador:** Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG  
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M972 Muraoka, Mariane Yumiko, 1993-

2021 Identificação de AGEs na saliva como método de diagnóstico do Diabetes Mellitus [recurso eletrônico] / Mariane Yumiko Muraoka. - 2021.

Orientador: Foued Salmen Espindola.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.859>  
Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - nº 12/2020 - PPGGB				
Data:	Vinte e oito de janeiro de dois mil e vinte e um.	Hora de início:	09:20h	Hora de encerramento:	10:00h
Matrícula do Discente:	11822GBI010				
Nome do Discente:	Mariane Yumiko Muraoka				
Título do Trabalho:	Quantificação de AGEs na saliva como método de diagnóstico do <i>Diabetes Mellitus</i> .				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Bioquímica do exercício				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Diagnóstico pela saliva: descoberta e inovação em biomarcadores para o exercício físico, estresse e saúde bucal.				

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e um, às 09:20 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Foued Salmen Espíndola (Orientador), Rafael Noal Moresco e Ana Paula de Melo Loureiro. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Foued Salmen Espíndola apresentou a Comissão Examinadora e o candidato (a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do

Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/01/2021, às 10:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Noal Moresco, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula de Melo Loureiro, Usuário Externo**, em 28/01/2021, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2528692** e o código CRC **C180C82B**.

Aos meus pais, Armando e Elza, pelo amor, carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, autor da vida, por ter me guiado com sua luz e ter me provido de força e sabedoria para percorrer esta jornada.

Aos meus pais, Armando e Elza, por serem tão presentes em minha vida, sempre me incentivando a seguir em frente e apoiando todas as minhas decisões. Minha eterna e profunda gratidão a vocês, que são meus bens mais preciosos.

Aos meus irmãos e cunhadas, Alexandre, Leandro, Mariana e Sarah, pelo apoio e por estarem sempre dispostos a estenderem as mãos sem medir esforços.

Ao meu orientador Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, por ter aberto as portas do laboratório e ter me aceitado como aluna de mestrado. Obrigada pela orientação e por todas as contribuições para conclusão desta etapa.

Aos meus amigos e parceiros de projeto, Allisson Benatti Justino e Douglas Carvalho Caixeta, por todos os ensinamentos, paciência e dedicação. Vocês foram essenciais para bom desenvolvimento deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Roland Teixeira, por ser sempre tão solícita no laboratório e pelos auxílios em experimentos, tornando possível o prosseguimento deste projeto.

Aos meus amigos e integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Camila Natalli, Heitor Cappato, Adriele Vieira, Júlia Silveira, Poliana Ribeiro, Natalia Tavernelli, Pedro Henrique André, Einy Siqueira, André Saraiva, Rodrigo Franco e Joed Lima, pela união dentro e fora do laboratório, pela parceria nos trabalhos, por todos os ensinamentos em bancada e pelos inúmeros momentos de lazer e alegria proporcionados por todos vocês. Tenho um enorme carinho por cada um. Muito obrigada!

À minha grande amiga, também integrante do laboratório, Letícia Afonso, que ao longo desses dois anos de mestrado se tornou uma parceira singular em minha vida. Obrigada por tudo e por todos os momentos compartilhados!

Às minhas queridas amigas, Amanda Cristine, Bruna Thaís, Nayhára Kyvia e Raquel Moreira, pela força que me deram desde o início desta jornada e por se fazerem presentes em minha vida. Obrigada pelo companheirismo de sempre!

A todos os professores, técnicos e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia em especial à secretária Janaína de Souza Mota, por sua eficácia e prontidão em informar e ajudar sempre que necessário.

À FAPEMIG pelos recursos financeiros que tornaram possível a realização e conclusão do projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para esta minha conquista, muito obrigada!



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Diabetes Mellitus .....	1
1.2. Hiperglicemia e complicações diabéticas .....	4
1.3. Produtos finais de glicação avançada (AGEs) .....	6
1.4. Albumina, lisozima e $\alpha$ -amilase salivar.....	12
1.5. Frutose e metilglioxal .....	14
1.6. AGEs e diabetes .....	16
1.7. Saliva .....	18
2. OBJETIVOS .....	20
2.1. Objetivo Geral .....	20
2.2. Objetivos Específicos .....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.1. Voluntários .....	20
3.1.1. Critérios de inclusão.....	21
3.1.2. Critérios de exclusão.....	21
3.2. Coleta e processamento da saliva .....	21
3.3. Purificação da alfa-amilase salivar .....	22
3.3.1. Coleta e preparo da amostra de saliva.....	22
3.3.2. Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose e diálise .....	22
3.4. Ensaio de glicação .....	22
3.4.1. Modelo BSA – frutose .....	22
3.4.2. Modelo BSA – metilglioxal.....	23
3.4.3. Modelo lisozima – frutose.....	23
3.4.4. Modelo lisozima – metilglioxal.....	23
3.4.5. Modelo saliva – frutose .....	24
3.4.6. Modelo saliva – metilglioxal.....	24
3.4.7. Modelo alfa-amilase salivar – frutose.....	24
3.4.8. Modelo alfa-amilase salivar – metilglioxal .....	25
3.5. Métodos de análises .....	25
3.5.1. Intensidade de fluorescência.....	25
3.5.2. Atividade da alfa-amilase salivar.....	25
3.5.3. Medição de grupos carbonila e tiól ligados a proteínas.....	26
3.5.4. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com SDS (SDS-PAGE).....	26

3.5.5. Western Blotting .....	27
3.5.6. Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) .....	27
3.6. Análises estatísticas .....	28
4. RESULTADOS .....	28
4.1. Intensidade de fluorescência .....	28
4.2. Atividade da alfa-amilase salivar .....	29
4.3. Proteína carbonilada .....	30
4.4. Grupos tióis .....	31
4.5. SDS-PAGE .....	32
4.6. Western Blotting .....	33
4.7. ATR-FTIR .....	34
5. DISCUSSÃO .....	38
6. CONCLUSÃO .....	47
REFERÊNCIAS .....	49
ANEXOS .....	71

## RESUMO

O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por altos níveis de glicose no sangue que resultam da deficiência absoluta ou relativa de insulina. Um dos principais mecanismos que leva às complicações envolvidas no DM, é a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs). O processo de glicação refere-se a uma sequência de reações não enzimáticas que se inicia quando açúcares redutores reagem com proteínas, lipídeos ou ácidos nucleicos, gerando os AGEs, que podem alterar a integridade dos tecidos. O objetivo do trabalho foi quantificar os AGEs na saliva pelo ensaio de glicação *in vitro*, possibilitando, assim, o desenvolvimento de um novo método de diagnóstico do DM. Albumina do soro bovino (BSA), lisozima, saliva e  $\alpha$ -amilase salivar foram glicados com frutose e metilglioxal (MGO). Foram realizadas análises de fluorescência (350nm<sub>ex</sub> e 420nm<sub>em</sub>), atividade da  $\alpha$ -amilase salivar, danos oxidativos, SDS-PAGE, *Western blotting* para detecção da  $\alpha$ -amilase salivar, e caracterização por espectroscopia de ATR-FTIR. A análise de fluorescência registrou aumentos na intensidade em todas as amostras glicadas, exceto na saliva com frutose. A atividade enzimática da  $\alpha$ -amilase salivar foi reduzida após glicação com frutose e MGO. Os danos oxidativos gerados por frutose e MGO foram determinados pelo aumento significativo no conteúdo de proteínas carboniladas em todas as amostras glicadas, exceto na saliva glicada com frutose. Já o conteúdo de sulfidrilas apresentou redução significativa nas amostras de lisozima com frutose e MGO e de saliva com MGO. No perfil eletroforético foi possível observar o surgimento de uma nova banda próximo a 95kDa em BSA com MGO. A lisozima glicada revelou bandas com pesos moleculares de 28, 36 e 55kDa após glicação. Na saliva foi observado diminuição na intensidade das bandas de pesos moleculares próximos a 80, 78, 56, 30 e 14kDa nas amostras glicadas, sendo essa diminuição mais acentuada na saliva com MGO. *Western blotting* realizado com as amostras de saliva mostrou redução na concentração de  $\alpha$ -amilase salivar, dada em % de densidade de pixels, após glicação com MGO. A utilização do ATR-FTIR permitiu avaliar e distinguir picos nos espectros em BSA e lisozima glicadas com frutose e MGO, e na saliva glicada com frutose. A partir dos

resultados é possível concluir que a saliva constitui um fluido possível de ser utilizado como indicador da presença de AGEs. Dessa forma, a identificação de AGEs na saliva representa uma alternativa vantajosa para avaliar a evolução do diabetes e a ocorrência de complicações crônicas desta doença.

Palavras chave: Produtos finais de glicação avançada, biomarcador, saliva, diabetes, FTIR, estresse oxidativo

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disorder characterized by high blood glucose levels that result from absolute or relative insulin deficiency. One of the main mechanisms that leads to complications involved in DM is the formation of advanced glycation end products (AGEs). The glycation process refers to a sequence of non-enzymatic reactions that begins when reducing sugars react with proteins, lipids or nucleic acids, generating AGEs, which can alter tissue integrity. The objective of the study was to quantify the AGEs in saliva by the *in vitro* glycation assay, thus enabling the development of a new method for diagnosing DM. Bovine serum albumin (BSA), lysozyme, saliva and salivary  $\alpha$ -amylase were glycated with fructose and methylglyoxal (MGO). Fluorescence analyzes ( $350\text{nm}_{\text{ex}}$  and  $420\text{nm}_{\text{em}}$ ), salivary  $\alpha$ -amylase activity, oxidative damage, SDS-PAGE, Western blotting to detect salivary  $\alpha$ -amylase, and characterization by ATR-FTIR spectroscopy were performed. The fluorescence analysis registered increases in intensity in all glycated samples, except in saliva with fructose. The enzymatic activity of salivary  $\alpha$ -amylase was reduced after glycation with fructose and MGO. The oxidative damages generated by fructose and MGO were determined by the significant increase in the content of carbonylated proteins in all glycated samples, except in the glycated saliva with fructose. The sulfhydryl content showed a significant reduction in the samples of lysozyme with fructose and MGO and saliva with MGO. In the electrophoretic profile it was possible to observe the appearance of a new band close to 95kDa in BSA with MGO. The glycated lysozyme revealed bands with molecular weights of 28, 36 and 55kDa after glycation. In the saliva a decrease in the intensity of the bands with molecular weights 80, 78, 56, 30 e 14kDa was observed in the glycated samples, this decrease being more accentuated in the saliva with MGO. Western blotting performed with the saliva samples showed a reduction in the concentration of salivary  $\alpha$ -amylase, given in % of pixel density, after glycation with MGO. The use of ATR-FTIR allowed to evaluate and distinguish peaks in the spectra in BSA and lysozyme glycated with fructose and MGO, and in glycated saliva with fructose. From the results it is possible to conclude that saliva is a fluid that can be used as an indicator of the presence of AGEs. Thus, the identification

of AGEs in saliva represents an alternative to evaluate the evolution of diabetes and the occurrence of chronic complications of this disease.

Keywords: Advanced glycation end products, saliva, biomarker, diabetes, FTIR, oxidative stress

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Via de sinalização da insulina .....	2
<b>Figura 2.</b> Principais vias de formação de AGEs .....	8
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de ação dos AGEs.....	12
<b>Figura 4.</b> Intensidade de fluorescência do BSA, lisozima, saliva e $\alpha$ -amilase salivar na presença de frutose ou MGO.....	29
<b>Figura 5.</b> Atividade da $\alpha$ -amilase salivar na presença de frutose e MGO.....	30
<b>Figura 6.</b> Conteúdo de proteínas carboniladas em BSA, lisozima e saliva na presença de frutose ou MGO .....	31
<b>Figura 7.</b> Conteúdo de sulfidrilas em BSA, lisozima e saliva na presença de frutose ou MGO.....	32
<b>Figura 8.</b> Perfil proteico (SDS-PAGE) indicando formação de AGEs a partir da glicação do BSA, lisozima e da saliva pela frutose e MGO.....	33
<b>Figura 9.</b> Western Blot e concentração da $\alpha$ -amilase salivar após glicação das amostras de saliva pela frutose e MGO .....	34
<b>Figura 10.</b> Espectro médio de ATR-FTIR e PCA nas amostras de BSA, BSA+F e BSA+MGO.....	36
<b>Figura 11.</b> Espectro médio de ATR-FTIR e PCA nas amostras de LYS, LYS+F e LYS+MGO.....	37
<b>Figura 12.</b> Espectro médio de ATR-FTIR e PCA nas amostras de SAL, SAL+F e SAL+MGO.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

3-DGO	3-desoxiglucosonal
ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosina Difosfato
AGER1	Receptor 1 de AGE
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
ATP	Adenosina Trifosfato
ATR	Reflexão total atenuada
BSA	Albumina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CEL	Carboxietil-lisina
CML	Carboximetil-lisina
CNP	2-cloro-4-nitrofenil
cRAGE	RAGEs catalíticos
DAG	Diacilglicerol
DHAP	Dihidroxiacetona-fosfato
DM	Diabetes Mellitus
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5'-ditiobisnitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
esRAGE	Receptor secretor endógeno para AGE
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GalG2CNP	2-cloro-4-nitrofenil-4-β-D-galactopiranosilmaltosídeo
GFAT	Glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase
GLUT 2	Transportador de glicose 2
GLUT4	Transportador de glicose 4
GO	Glioxal
GSH	Glutationa
HbA1c	Hemoglobina glicada
HMGB1	High mobility group box 1



HSA	Albumina sérica humana
IDF	Internacional Diabetes Federation
IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 $\alpha$
IL-6	Interleucina-6
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
K <sup>+</sup>	Potássio
kDa	Kilodalton
KSCN	Tiocianato de potássio
Lys	Lisozima
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitogênio
MES	Tampão ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MG-H1	Hidroimidazolona 1 derivada do metilglioxal
MGO	Metilglioxal
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MOLD	Dímero de metilglioxal-lisina
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NF $\kappa$ $\beta$	Fator nuclear kappa beta
NH <sub>2</sub>	Amino
PBS-T	Tampão fosfato-salino
PCA	Análise de componentes principais
PDK	Fosfatidilinositol-dependente
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB ou Akt	Proteína quinase B
PKC	Proteína quinase C
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
SDS	Dodecil- sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
sRAGE	RAGE solúvel

TCA	Ácido tricloracético
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
Tris-HCl	Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
UDPGlcNAc	Uridina difosfato-N-acetilglucosamina
VCAM1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Diabetes Mellitus

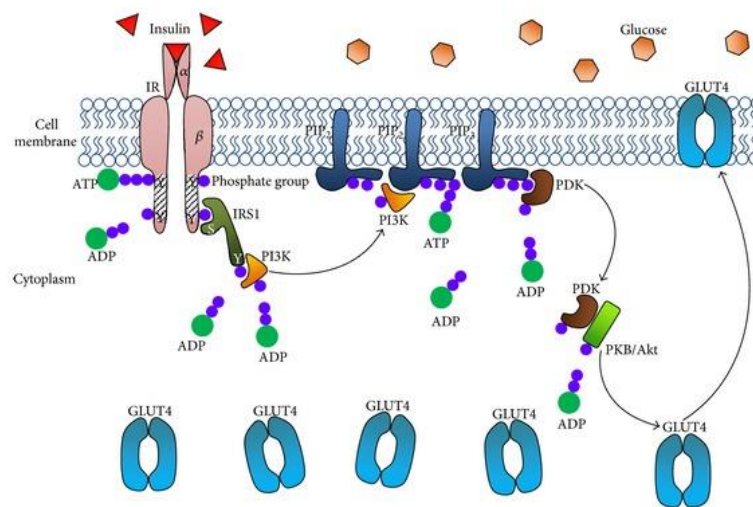
O Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por altos níveis de glicose no sangue que resultam da deficiência absoluta ou relativa de insulina, por disfunção das células  $\beta$  pancreáticas, resistência à insulina ou ambos (COLE e FLOREZ, 2020). É um importante e crescente problema de saúde para todos os países, independentemente do seu grau de desenvolvimento. De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes existem 463 milhões de adultos com diabetes em todo o mundo. A prevalência global de DM atingiu 9,3%, com mais da metade (50,1%) dos adultos não diagnosticados. A previsão é que o número total de pessoas com DM aumente para 578 milhões em 2030 e para 700 milhões em 2045 (International Diabetes Federation - IDF, 2019).

A insulina é um hormônio polipeptídico secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans no pâncreas e junto com seu principal hormônio contrarregulador, glucagon, regula as concentrações de glicose no sangue, sendo necessária para o transporte de glicose para as células de tecidos sensíveis à insulina, seja para uso como combustível ou para armazenamento (DODSON e STEINER, 1998; KAHN, MCCULLOCH e PORTE, 1997).

O principal estímulo para a secreção da insulina é a glicose, embora outros macronutrientes, hormônios, fatores humorais e estímulos neurais possam modificar essa resposta. O GLUT2 expresso nas células  $\beta$  pancreáticas é sensível à glicose e realiza seu transporte por difusão facilitada para o interior dessas células (FU, GILBERT e LIU, 2013). A entrada da glicose na célula  $\beta$  é detectada pela glicoquinase, que fosforila a glicose em glicose-6-fosfato, gerando ATP (FERNANDES et al., 2000). O aumento da razão ATP/ADP intracelular leva ao fechamento dos canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, despolarização da membrana, abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  voltagem-dependentes, influxo de  $Ca^{2+}$  e futura ativação da exocitose dos grânulos de insulina na corrente sanguínea (FU, GILBERT e LIU, 2013).

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana (IR – Insulin Receptor), uma proteína

heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  permite que a subunidade  $\beta$  adquira atividade quinase, levando a uma alteração conformacional e autofosforilação (PATTI e KAHN, 1998). Ocorre sequencialmente o recrutamento de proteínas e fosforilação de diversos substratos proteicos, dentre os quais estão os membros da família do substrato do IR (IRS-1, 2, 3 e 4). Estes, quando fosforilados em tirosina, ligam-se e ativam a proteína fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (RAMALINGAM, OH e THURMOND, 2013). A PI3K catalisa a formação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), um regulador alostérico da quinase fosfatidilinositol-dependente (PDK). A PDK ativa uma das isoformas da proteína quinase B (PKB), também conhecida como Akt (GAGLIARDI et al., 2012; XIAO e LIU, 2013). A fosforilação da Akt auxilia na translocação de GLUT4 para a membrana plasmática para captação da glicose em células musculares e adiposas (WHITEMAN; CHO; BIRNBAUM, 2002) (Figura 1).



**Figura 1.** Via de sinalização da insulina em estado normal para captação de glicose (Mohd-Radzman et al., 2013)

O DM é classificado em tipo 1, tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos. O DM tipo 1 é caracterizado pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, culminando em deficiência absoluta de insulina. A maioria dos casos é atribuível a uma destruição autoimune de células  $\beta$ , mediada por células como linfócitos T ou macrófagos, enquanto uma pequena minoria de casos resulta de uma

destruição idiopática ou falha de células  $\beta$ . O DM tipo 1 é responsável por 5 a 10% do total de casos de diabetes em todo o mundo (American Diabetes Association – ADA, 2019).

O DM tipo 2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de diabetes. Possui etiologia complexa e multifatorial, envolvendo componentes genéticos e ambientais (SKYLER et al., 2017). O principal fenômeno fisiopatológico é a resistência à ação da insulina, diminuindo a captação de glicose em tecidos dependentes de insulina, como tecido muscular e adiposo. Em estágios iniciais da doença, em resposta a essa resistência, ocorre hiperinsulinemia compensatória durante vários meses ou anos. Com o avanço da doença, por causa da disfunção e redução das células  $\beta$ -pancreáticas, a síntese e secreção de insulina podem ficar comprometidas (MATTHAEI et al., 2000). Embora a arquitetura genética possa determinar parcialmente respostas às mudanças ambientais, os principais fatores da epidemia global do DM tipo 2 são o aumento da obesidade, estilo de vida sedentário, maus hábitos alimentares e envelhecimento da população (CHATTERJEE, KHUNTI E DAVIES, 2017).

O DM gestacional foi definido como uma condição caracterizada por rápida intolerância à glicose e resistência à insulina reconhecida pela primeira vez durante a gravidez (METZGER e COUSTAN, 1998). O período de gestação é caracterizado por alterações metabólicas e, dentre elas, a resistência à insulina, apresentado uma produção aumentada deste hormônio em resposta à ação de outros hormônios como a progesterona, cortisol, prolactina e lactogênio placentário, que agem diretamente antagonizando a ação da insulina ou, indiretamente, diminuindo a sensibilidade à insulina (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2008).

Na categoria “outros tipos de DM” destaca-se o *Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)*, um tipo monogênico de diabetes, que acomete indivíduos com menos de 25 anos e não-obesos. Representa uma porcentagem muito pequena de pessoas acometidas e é caracterizado por defeito na secreção de insulina, porém, sem causar dependência da mesma (FAJANS, BELL e POLONSKY, 2001). Outros tipos secundários de DM são induzidos por pancreatite, síndrome de Cushing, síndrome de Klinefelters e hipertireoidismo. Alguns medicamentos e produtos químicos como diuréticos tiazídicos,  $\beta$ -bloqueadores e antipsicóticos podem também causar DM (KAUL et al. 2012).

De acordo com a ADA (2019), o diabetes pode ser diagnosticado com base nos critérios de glicose plasmática, pelo valor de glicemia em jejum superior a 126 mg/dl ou de glicemia 2h após sobrecarga com 75g de glicose - teste oral de tolerância à glicose - acima de 200 mg/dl; e com base em critérios de hemoglobina glicada (HbA1c) apresentando valor maior que 6,5%. O diabetes também é diagnosticado em indivíduos que apresentem sintomas clássicos de hiperglicemia com glicose plasmática aleatória superior a 200 mg/dl (HERMAN, KALYANI e CHERRINGTON, 2017).

## **1.2. Hiperglicemia e complicações diabéticas**

A glicose sanguínea elevada é uma marca registrada de todos os tipos de diabetes, resultado da deficiência e/ou resistência à insulina. Níveis aumentados de glicose circulante têm sido propostos como mediadores de muitos efeitos celulares deletérios do diabetes (BROWNLEE, 2005). Esse distúrbio está associado a danos a longo prazo em ambos os grandes e pequenos vasos sanguíneos por todo o corpo, referidos como sistemas macrovascular e microvascular, respectivamente (COLE e FLOREZ, 2020). Embora os danos induzidos por hiperglicemia do sistema macrovascular, incluindo artérias cerebrovasculares e coronarianas, sejam a principal causa de morte de indivíduos diabéticos, os danos gerados no sistema microvascular são muito mais comuns e apresentam efeito substancial na mortalidade (MORRISH et al., 2001; DESHPANDE, HARRIS-HAYES e SCHOOTMAN, 2008).

O estado hiperglicêmico no diabetes pode ser considerado o principal fator iniciador dos danos microvasculares nas células endoteliais, capilares da retina, células mesangiais no glomérulo renal, neurônios e células de Schwann nos nervos periféricos. Essas células estão mais vulneráveis aos surgimentos das complicações crônicas do DM, pois não possuem um sistema de transporte de glicose eficiente intra-extra celular, permanecendo constantemente com sua concentração de glicose interna elevada; e as células endoteliais vasculares e mesangiais renais expressam altos níveis do transportador de glicose 1, tornando mais suscetíveis às complicações associadas à hiperglicemia (BROWLEE, 2005; BARBOSA et al., 2008 e FOSS-FREITAS, 2003; SINGH et al., 2014). As complicações no indivíduo diabético geradas pelos danos no

sistema microvascular envolvem quatro mecanismos: via dos polióis, ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC), via da hexosamina e as ações dos produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês advanced glycation end-products), que podem ser formados de maneira endógena ou exógena (BROWNLEE, 2005).

A via dos polióis envolve a redução enzimática de um hidrato de carbono, como a glicose, a um poliál acíclico, como o sorbitol, pela ação enzimática da aldose redutase, e reoxidada a um outro hidrato de carbono, a frutose, pela sorbitol desidrogenase (BARREIROS, BOSSOLAN e TRINDADE, 2005). Dessa forma, em um estado hiperglicêmico ocorre aumento da formação do sorbitol e frutose, que quando acumulados dentro da célula causam aumento da osmolaridade, ocasionando influxo de água e consequências funcionais graves para a célula (FEENER e KING, 1997). Além disso, no processo de redução da glicose a sorbitol, a aldose redutase consome o cofator NADPH, que também é um cofator essencial para a glutathione redutase regenerar a glutathione (GSH). Assim, ao reduzir a quantidade de glutathione, a via do poliál aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo intracelular (BROWNLEE, 2005).

A hiperglicemia intracelular aumenta a síntese de novo de diacilglicerol (DAG) a partir do intermediário glicolítico dihidroxiacetona fosfato que reduz a glicerol-3-fosfato e este passa por reações de acilação (KOYA e KING, 1998). O DAG é o principal ativador fisiológico da PKC, que regula uma série de funções vasculares (SCHAAN, 2003). Dessa forma, a via DAG-PKC tem uma importância na regulação da permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas, adesão leucocitária, sendo todas essas alterações descritas no diabetes (KOYA e KING, 1998).

O desvio do excesso de glicose intracelular para a via da hexosamina também pode manifestar várias complicações diabéticas. Nessa via, a frutose-6-fosfato proveniente da glicólise é desviada para uma via de sinalização na qual a enzima glutamina:frutose-6-fosfato aminotransferase (GFAT) converte a frutose-6-fosfato em glicosamina-6-fosfato e finalmente em uridina difosfato-N-acetilglucosamina (UDPGlcNAc), resultando em alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (KOLM-LITTY et al., 1998; BROWNLEE, 2005 e DU et al., 2000).

As complicações diabéticas possuem origem multifatorial, mas, em particular, o processo bioquímico da glicação avançada, pela reação de Maillard e consequente formação de AGEs, que é acelerado no diabetes como resultado da hiperglicemia crônica e aumento do estresse oxidativo, desempenha um papel central nesses distúrbios (GOH e COOPER, 2008). A glicação pode afetar todas as proteínas do organismo, incluindo proteínas circulantes, extracelulares e intracelulares. Alguns exemplos incluem hemoglobina, albumina, imunoglobulinas, colágenos, entre outros (BOULANGER, DEQUIEDT e WAUTIER, 2002).

### **1.3. Produtos finais de glicação avançada (AGEs)**

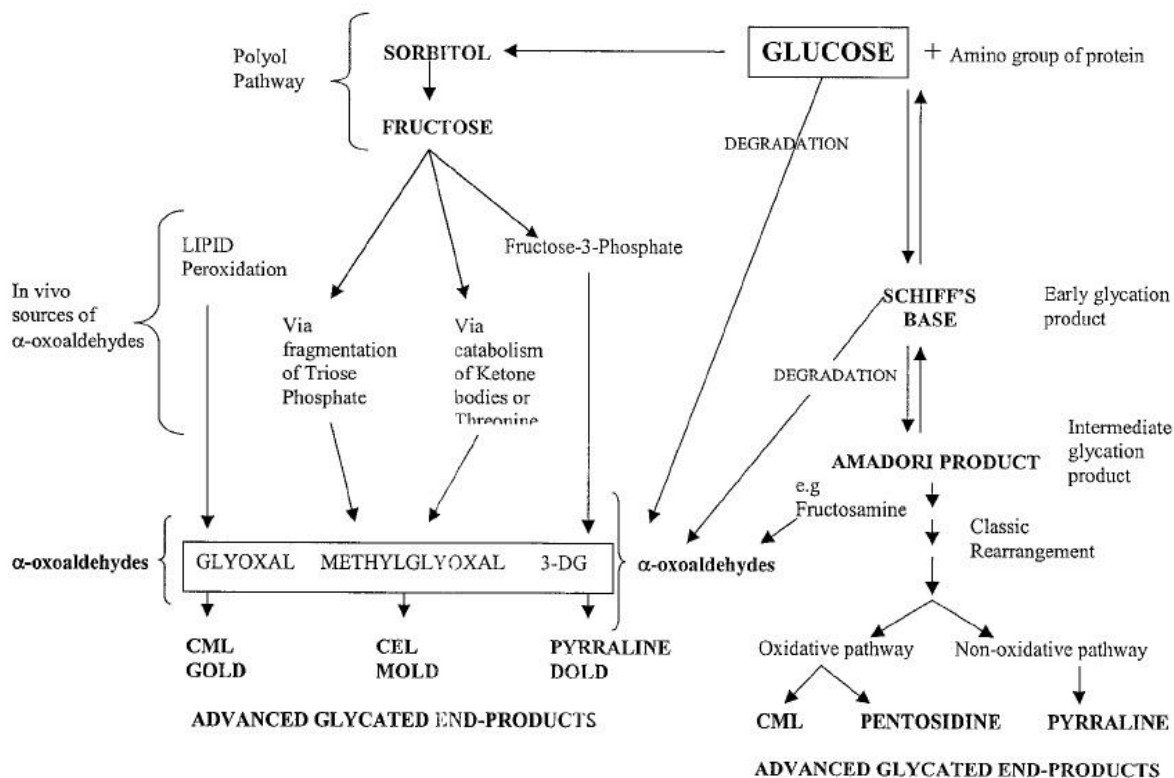
O processo de glicação refere-se a uma sequência de reações não enzimáticas que se inicia quando açúcares redutores como glicose e frutose reagem com grupos nucleofílicos de aminoácidos constituintes de proteínas, lipídeos ou ácidos nucleicos, o que geram os AGEs (ZHANG et al., 2008). A via clássica da reação de Maillard inicia-se com a formação de base de Schiff instável, gerada pela condensação de grupamento carbonila de açúcar redutor, com um grupamento amina, oriundo, por exemplo, do aminoácido lisina, composto especialmente suscetível à reação. Na sequência, a base de Schiff sofre rearranjos, tornando essa estrutura mais estável, o produto de Amadori ou produtos iniciais da reação de Maillard. Os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários acessíveis, dando origem aos AGEs (BIERHAUR et al., 1998 e MONNIER, 2003). Além da reação de Maillard, outras vias também podem formar AGEs endógenos. Por exemplo, a autooxidação da glicose e a peroxidação de lipídeos em derivados de compostos dicarbonílicos por um aumento no estresse oxidativo são vias descritas para formação de AGEs (URIBARRI e TUTTLE, 2006). Outro mecanismo é a via do poliol, no qual metabólitos da frutose, como a frutose-3-fosfato, são convertidos em  $\alpha$ -oxaldeídos e interagem com monoácidos para formar os AGEs (LORENZI, 2007).

Além da formação de AGEs endógenos, os AGEs e seus precursores também são absorvidos pelo corpo a partir de fontes exógenas, como pela fumaça do cigarro e através do consumo de alimentos processados altamente



aquecidos. A globalização e os métodos industrializados de processamento de alimentos alteram drasticamente as dietas para conferir propriedades desejáveis como maior vida útil, esterilidade, sabor e cor, aumentando, assim, a exposição aos AGEs (CORDAIN et al., 2005; HENLE, 2005). O processamento desses alimentos, especialmente o aquecimento prolongado, tem um efeito acelerador na geração de produtos de glicoxidação e lipoxidação, e uma proporção significativa de AGEs ingeridos é absorvida com os alimentos (TESSIER e BIRLOUEZ-ARAGON, 2012; GOH e COOPER, 2008). O conteúdo de AGEs na alimentação depende da composição dos nutrientes, temperatura, método e duração de aplicação do calor no preparo (GOLDBERG et al., 2004). Estudos demonstraram que aproximadamente 10-30% dos AGEs consumidos pela dieta são absorvidos (FAIST e ERBERSDOBLER, 2001). Dessa fração absorvida, cerca de dois terços são retidos no organismo e apenas um terço é excretado pela urina, dentro de 48 horas, em indivíduos com função renal normal (KOSCHINSKY et al., 1997).

Mais de 20 diferentes AGEs foram identificados no sangue e tecido humanos e nos alimentos. Pode-se dividir os AGEs em fluorescentes e não-fluorescentes, sendo os principais AGEs fluorescentes: pentosidina e o dímero de metilglioxal-lisina (MOLD); e os principais AGEs não-fluorescentes: carboximetil-lisina (CML), carboxietil-lisina (CEL) e pirralina. Embora possuam diversas estruturas químicas, uma característica comum aos AGEs é a presença de resíduo de lisina (PERRONE et al., 2020).



**Figura 2.** Principais vias de formação de AGEs. 3-DG: 3-deoxiglicossina; CML: carboximetil-lisina; GOLD: dímero de glioxal-lisina; CEL: carboxietil-lisina; MOLD: dímero de metilglioxal-lisina; DOLD: dímero de deoxiglicossina-lisina (SINGH et al., 2001).

Os AGEs se acumulam nos tecidos durante o envelhecimento e em uma taxa acelerada no diabetes (STERN et al., 2002). A natureza potencialmente prejudicial de uma proteína glicada depende da duração de seu ciclo de vida. As proteínas glicadas de vida longa podem levar à formação de AGEs, que desempenham um papel significativo na glicotoxicidade (FOURNET, BONTÉ e DESMOULIÉRE, 2018). Ambos os AGEs, endógenos e exógenos, são difíceis de degradar e metabolizar devido à reação de ligação química específica, o que pode explicar seu acúmulo contínuo e relacionado à idade. (BĂBȚAN, 2019). Esse acúmulo é irreversível, portanto, a sua formação é susceptível de conferir um efeito a longo prazo sobre os tecidos (ARONSON, 2002; BROWLEE, CERAMI e VLASSARA, 1988). Os AGEs estão relacionados à capacidade desses compostos de modificar as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas. A ligação entre AGEs e seus receptores, ativa as NADPH oxidases, que geram ânions superóxido através da transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, contribuindo assim para o

aumento de radicais livres e estresse oxidativo. E ainda, por meio da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (NOWOTNY, 2015, JAKUS e RIETBROCK, 2004 e AHMED, 2005). Por meio da geração de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas ou de interações com receptores celulares, os AGEs promovem, respectivamente, estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (JAKUS e RIETBROCK, 2004 e AHMED, 2005).

Os AGEs podem alterar a integridade dos tecidos por meio de dois mecanismos distintos. O primeiro é através da modificação de estruturas nativas de biomoléculas (BROWNLEE, 2001). Neste contexto, a glicação de proteínas representa a maior fonte de modificações em biomoléculas com consequências na homeostase. Os AGEs podem modificar as proteínas em seu sítio de ligação para enzimas ou receptores, resultando assim na desregulação do reconhecimento, degradação e rotatividade das proteínas correspondentes (BROWNLEE, 1995; TAGHAVI et al., 2017). As proteínas que constituem a matriz extracelular também estão suscetíveis à ação dos AGEs, comprometendo a conformação geométrica dessas proteínas, causando anormalidades estruturais e funcionais permanentes. Os AGEs são frequentemente encontrados na matriz celular e, portanto, células da matriz modificadas prejudicam as interações matriz-matriz, bem como as interações matriz-célula (NOWOTNY, 2015). Um exemplo é a formação de ligações cruzadas entre AGEs e colágeno tipo 1, que resulta em aumento da rigidez vascular (GOLDIN et al., 2006). Os AGEs acarretam também em modificações em nucleotídeos, na deficiência do sistema imunológico por afetarem as imunoglobulinas e alterações em lipoproteínas (MIR et al., 2014; ROBERTS et al., 2003; DOLHOFER-BLIESENER e GERBITZ, 1990; BACCHETTI et al., 2014).

O segundo mecanismo pelo qual os AGEs danificam os tecidos se dá pela interação desses compostos com receptores específicos presentes na superfície de diversas células, desencadeando vias de sinalização com efeitos patológicos (AHMED, 2005). Entre uma variedade de receptores de AGEs ou proteínas ligantes de AGEs que têm sido descritos na literatura, o receptor RAGE (do inglês, *receptor for advanced glycation end products*) é provavelmente a

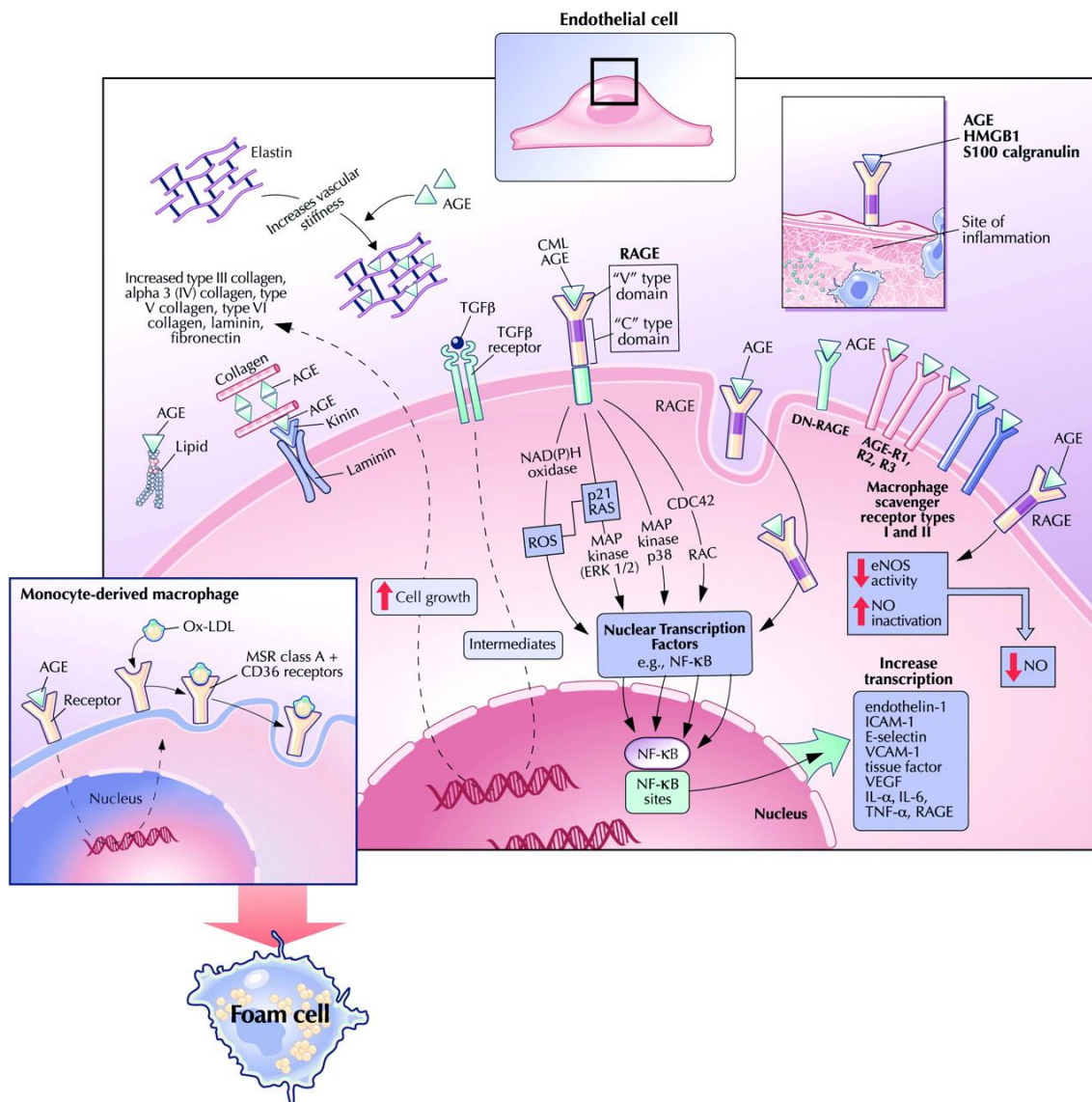
molécula mais bem caracterizada (LIN, 2006). O RAGE é uma molécula de superfície celular da família da imunoglobulina multiligante, que possui um polipeptídeo de 35kDa com uma sequência única na extremidade NH<sub>2</sub> e HMGB1 (do inglês, *high mobility group box 1*) (KOSCHINSKY et al., 1997). Sendo uma proteína de membrana integral, os RAGES formam uma parte central do local de ligação da superfície celular para AGEs (HOFFMAN et al., 1999). A interação AGE-RAGE afeta a iniciação e ativação de vias de sinalização, levando ao aumento de várias citocinas inflamatórias (AHMAD et al., 2018). Os RAGES são expressos em vários tipos de células, como células vasculares, células do sistema imunológico, neurônios, cardiomiócitos, adipócitos, células epiteliais glomerulares ou podócitos, células epiteliais pulmonares e uma ampla gama de células transformadas, tanto em modelos animais como em humanos (SHEKHTMAN et al., 2017; RAMASAMY, SHEKHTMAN e SCHMIDT, 2016).

A interação dos AGEs com o receptor RAGE desencadeia a ativação das proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPKs) e das vias da PI3K, que levarão à ativação do fator de transcrição NFκβ (fator nuclear kappa beta). A ativação do NFκβ modula a transcrição gênica para endotelina 1, fator tecidual, trombosmodulina, molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e geração de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1α (IL-1α), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF-α), (BIERHAUS et al., 2005; GOLDIN et al., 2006; NEUMANN et al., 1999). Ao ativar a via do NFκβ, um feedback positivo é estabelecido, o que resulta em aumento na expressão de RAGE, aumentando ainda mais o nível de inflamação (LUKIC et al., 2008). Além disso, a interação AGE-RAGE ativa a NADPH oxidase, e quando este complexo é regulado positivamente, aumenta o estresse oxidativo intracelular. E esse aumento de estresse oxidativo também aumenta NFκβ (WAUTIER et al., 2001).

Além do RAGE expresso na superfície das células, isoformas têm sido descritas deste receptor. O RAGE solúvel (sRAGE) é uma variante deste receptor e foi detectado no plasma e em outros compartimentos de fluido como líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano e líquido de lavagem broncoalveolar (SCHMIDT, 2015; KAMO et al., 2016). O sRAGE não tem a extremidade COOH e os domínios transmembrana e pode se ligar a ligantes extracelulares (AHMAD et al., 2018). Existem dois tipos de sRAGE: os RAGES catalíticos (cRAGE), que

são receptores circulantes produzidos por clivagem proteolítica de um RAGE completo, mediado por desintegrinas e metaloproteinases; e aqueles gerados por splicing alternativo do mRNA de um RAGE completo, denominado receptor secretor endógeno para AGE (esRAGE) (TAM et al., 2011). Os sRAGEs circulam na corrente sanguínea e se ligam aos AGEs, limitando assim os efeitos patológicos causados quando os AGEs se ligam aos RAGEs da superfície celular e portanto, desempenham um papel protetor contra a toxicidade por AGEs em circulação (FOURNET, BONTÉ e DESMOULIÉRE, 2018; SCHMIDT, 2015).

Outro receptor que também é capaz de reconhecer e ligar-se aos AGEs é o receptor 1 de AGE (AGER1). O AGER1 é uma proteína transmembrana do tipo 1 específica de AGE e está presente na superfície celular de macrófagos, células mesangiais e mononucleares (CAI et al., 2008; HE et al., 2001). Possui características anti-inflamatórias e reduz o estresse oxidativo por várias vias. A ativação de AGER1 suprime a atividade da MAPK e NF $\kappa$ B, aumenta a degradação de AGEs e inibe a produção de espécies reativas de oxigênio induzidas por AGEs (CAI et al., 2006). A degradação de AGEs por AGER1 produz peptídeos AGEs que normalmente são filtrados através da membrana glomerular. O filtrado sofre grau variado de reabsorção tubular ou catabolismo adicional nos túbulos proximais e é excretado na urina (SAITO et al., 2003). Assim, a ligação AGE-AGER1 desencadeia mecanismos de defesa para neutralizar os efeitos deletérios dos AGEs (PRASAD e MISHRA, 2018).



**Figura 3.** Mecanismos de ação dos AGEs: formação de ligações cruzadas em moléculas da matriz extracelular; e interação dos AGEs com os receptores celulares RAGE e AGER (GOLDIN et al., 2006).

#### 1.4. Albumina, lisozima e α-amilase salivar

A albumina representa a proteína mais abundante, constituindo cerca de 50% das proteínas presentes no plasma de indivíduos saudáveis e possui uma grande variedade de funções fisiológicas e farmacológicas, incluindo a manutenção da pressão oncótica, ligação e transporte de diversos metabólitos como íons metálicos, ácidos graxos, bilirrubina, drogas e óxido nítrico, e contribuição com a capacidade antioxidante do plasma sanguíneo (EVANS, 2002; WALDMANN, 1977 e WOOD, 1986). Devido ao seu longo tempo de meia-vida em comparação com outras proteínas e sua alta concentração, a albumina

sérica é uma proteína plasmática altamente sensível à glicação (ROUNDEAU e BOURDON, 2011). A estrutura terciária da albumina é composta por três domínios em grande parte helicoidal, que são altamente conservados entre as espécies. Por exemplo, a albumina de soro bovino (BSA) mostra alta homologia com a albumina de soro humano (HSA), sequências homólogas em cerca de 80%, o que fornece uma estratégia de pesquisa econômica, já que é amplamente utilizada em estudos de interações proteína-ligante e possui menor custo quando comparada à albumina humana (ARASTEH et al., 2014; SZAPACS, 2006; ZHANG et al., 2016).

Dessa forma, tem crescido o interesse em pesquisas que tratam da glicação de HSA e proteínas estreitamente relacionadas, como o BSA. Estudos que envolvem a albumina glicada têm sido realizados utilizando modelos de glicação *in vivo* e *in vitro* utilizando BSA (ŻURAWSKA-PŁAKSEJ et al., 2018; JUSTINO et al., 2019; FRANCO et al., 2020). O nível de HSA glicada é usado como marcador de curto a médio prazo para controle glicêmico no diabetes (ANGUIZOLA, 2013). Portanto, devido a sua grande homologia de sequência com a forma humana, o BSA torna-se um modelo de proteína relevante em estudos relacionados ao diabetes.

As lisozimas são importantes proteínas de defesa antibacteriana presentes em altos níveis na saliva, secreção nasal, muco, soro e nos lisossomos de neutrófilos e macrófagos. Elas geralmente se ligam e matam as bactérias através de mecanismos independentes do sistema imunológico (LI, 1998). A lisozima obtida pela clara do ovo de galinha tem peso molecular de aproximadamente 14.5 kDa, compreende 129 aminoácidos e a presença de quatro ligações dissulfeto aumenta a sua estabilidade. Sabe-se que esta lisozima possui estrutura tridimensional bem definida, mecanismo de dobragem e parâmetros termodinâmicos (BLAKE et al., 1965). A lisozima humana apresenta uma estrutura homóloga a da clara do ovo de galinha (PEPYS et al. 1993). Essa proteína afeta os peptidoglicanos da parede celular de bactérias gram-positivas e catalisa sua degradação (IBRAHIIM et al., 2002 e POWROZNIK et al., 2004). O equilíbrio entre a superfície hidrofílica/hidrofóbica da lisozima desempenha um papel importante em sua atividade catalítica e o processo de glicação afeta esse equilíbrio diminuindo a atividade hidrolítica da lisozima (LONGO e COMBES 1995).

A  $\alpha$ -amilase salivar é uma enzima que catalisa a hidrólise de ligações 1- $\alpha$ ,4 glicosídicas do amido para produzir maltose, maltotriose e dextrina, sendo uma das enzimas mais importantes na saliva (YANG et al., 2015). Duas famílias de  $\alpha$ -amilase podem ser distinguidas: uma na forma glicosilada e tem um peso molecular de 62 Kd, e outra não glicosilada com peso molecular de 56 Kd (KAUFFMAN et al., 1970). Essa enzima é responsável por 40-50% do total de proteínas produzidas por glândulas salivares, a maior parte desta enzima é sintetizada e secretada por células acinares da glândula parótida (ZAKOWSKI e BRUNS, 1985; MAKINEN, 1989). Além da atividade enzimática, tem sido sugerido que a  $\alpha$ -amilase impede a ligação de bactérias às superfícies orais e permite a depuração bacteriana da boca (BOSCH et al., 2003). Dada a sua importância, muitos trabalhos têm sido realizados envolvendo esta enzima. Pesquisas sugerem que a  $\alpha$ -amilase salivar pode apresentar forte potencial diagnóstico (AYDIN, 2007; NICOLAU, 1966; AZZOPARDI, 2016). E ainda, muitos estudos têm utilizado compostos com potencial de inibir a atividade da  $\alpha$ -amilase salivar como possíveis tratamentos para o diabetes (MARTINEZ-GONZALEZ, 2019; FRANCO et al., 2018; JUSTINO et al., 2016).

### **1.5. Frutose e metilglioxal**

Os AGEs representam classes de proteínas modificadas por ação dos açúcares ou seus produtos de degradação (VISTOLI et al., 2013). No processo de glicação a estrutura do açúcar influencia a susceptibilidade à reação, sendo a reatividade dos monossacarídeos diretamente relacionada com a abundância de suas formas em cadeia aberta, que variam de 0,0002% para a glicose a 0,7% para a frutose, justificando a menor reatividade da glicose dentre os açúcares (LAROQUE et al., 2008).

A frutose é um importante carboidrato encontrado no organismo humano e na maioria das plantas, tendo sido isolada pela primeira vez em 1847 a partir da cana-de-açúcar (WANG e VAN, 1981). Este carboidrato vem sendo empregado como adoçante de bebidas e frutas industrializadas, constituindo de 4,0% a 8,0% de seu peso em decorrência de algumas características, como maior solubilidade em soluções aquosas e pelo fato de ser mais doce, cerca de



1,7 vezes que a sacarose (HALLFRISCH, 1990). No final da década de 1960, com o xarope de milho rico em frutose sendo o principal açúcar utilizado para adoçar alimentos industrializados, a presença de frutose na dieta aumentou notavelmente (ANGELIS et al., 2007). O crescimento do consumo de frutose e a ampliação da incidência da obesidade na população levaram alguns pesquisadores a sugerirem que uma dieta rica em frutose contribui decisivamente para o ganho de peso corporal. A frutose de fato possui características metabólicas que podem potencialmente contribuir para o aumento da adiposidade corporal e resistência insulínica ou síndrome metabólica (TEFF et al., 2009). Considerando a importância deste açúcar como monossacarídeo de ocorrência mais comum na dieta humana, especialmente devido à adição usual do xarope de frutose em bebidas industrializadas, é possível deduzir o papel crítico desse açúcar para o processo de glicação em alimentos (BARBOSA et al., 2016).

Mais de 90% da frutose ingerida é metabolizada pelo fígado, onde estimula a lipogênese de novo para conduzir à síntese de triglicerídeos hepáticos (LIM et al., 2010). Estudos demonstraram que apesar do efeito lipogênico bem conhecido, a exposição crônica à frutose gera a formação de AGEs em maiores níveis do que a glicose (MASTROCOLA et al., 2013). Além das fontes exógenas deste açúcar, a hiperglicemia persistente em condição diabética também facilita a síntese endógena de frutose pela via dos polióis (RAI et al., 2019). A frutose produzida por esta via pode ser fosforilada em frutose-6-fosfato, que é decomposta em 3-desoxiglucosona; ambos os compostos são poderosos agentes glicantes que entram na formação de AGEs (SZWERGOLD, KAPPLER e BROWN, 1990; GONZÁLEZ, 1988). No contexto da glicação de proteínas, a taxa de glicação induzida por frutose é mais rápida do que a glicação induzida por glicose e, portanto, a frutose e seus metabólitos são considerados precursores importantes na formação de AGEs (RUDERMAN, WILLIAMSON e BROWNLEE, 1992; SAKAI, OIMOMI e KASUGA, 2002).

A reação entre glicose ou frutose e os grupos de aminoácidos de uma proteína forma a base de Schiff. No caso da glicose, a base de Schiff sofre um rearranjo de Amadori para produzir um composto mais estável. Com a frutose a reação é semelhante, mas a reação é denominada produto de Heyns (com carbono 2 em vez de carbono 1 da hexose). E então, os produtos de glicação

precoce passam por rearranjos para formação de derivados irreversivelmente reticulados ou AGEs (GUGLIUCCI, 2017).

Os açúcares redutores não contribuem apenas diretamente para a formação de AGEs, mas também levam ao acúmulo de moléculas dicarbonil, que são altamente reativas. Essas moléculas, são chamadas espécies reativas de carbonil e podem induzir ao estresse dicarbonílico. As espécies reativas de carbonil compreendem o glioxal (GO), metilglioxal (MGO) e 3-desoxiglucozona (3-DGO), que irão contribuir para a formação de AGEs (BELLIER et al., 2019). O MGO (piruvaldeído ou 2-oxopropanal) está presente em todos os organismos biológicos e é formado a partir da degradação não enzimática de metabólitos endógenos, principalmente os intermediários glicolíticos gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), e em menor extensão, metabólitos do metabolismo de lipídeos e aminoácidos (ALLAMAN, BÉLANGER e MAGISTRETTI, 2015). A formação de MGO por várias vias metabólicas provoca efeitos patofisiológicos presentes no diabetes envolvendo a geração de radicais livres, estado antioxidante reduzido, glicação de proteínas e ácidos nucleicos e indução da interação AGE-RAGE (DORNADULA, 2015). Altos níveis de MGO ocorrem quando as concentrações de seus precursores estão elevadas, como na hiperglicemia, na utilização prejudicada da glicose e pela deficiência de triosefosfato isomerase (AHMED et al., 2003). O acúmulo de MGO nas células é altamente deletério, uma vez que este composto é um dos mais potentes agentes glicantes, sendo 10.000-50.000 vezes mais ativo do que a glicose, que reage prontamente com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos para formar os AGEs (WAUTIER JL, GUILLAUSSEAU, 2001; THORNALLEY, 2005).

O MGO geralmente é removido da célula pelo sistema glioxalase. No entanto, parte deste composto escapa continuamente da desintoxicação à medida que os adutos reversíveis se reorganizam em AGEs, principalmente com resíduos de arginina produzindo adutos de imidazolona cíclicos (THORNALLEY et al., 2003; HENLE et al., 1994). Muitos estudos encontraram alto grau de correlação entre os níveis de MGO, AGEs e complicações diabéticas (PAPADAKI et al., 2018; ANDERSEN et al., 2018; VANDER JAGT et al., 2001).

## **1.6. AGEs e diabetes**

A formação e o acúmulo de AGEs ocorrem cada vez mais em condições diabéticas e podem permanecer por muito tempo nos tecidos, acentuando as complicações associadas ao diabetes (MONNIER, SELL e GENUTH, 2005). Assim como neste trabalho, que consistiu na glicação de proteínas e saliva, a grande maioria dos estudos utiliza análises de proteínas glicadas e AGEs para investigar sua relevância como marcadores ou preditores potenciais do diabetes e suas complicações (FISHMAN et al., 2018; SIMÓ-SERVAT et al., 2018; CHIU et al., 2018).

Em indivíduos diabéticos, a formação de AGEs é acelerada devido ao aumento da concentração de glicose circulante, precursores de AGEs e estresse oxidativo. No soro e tecidos de diabéticos podem ser encontrados níveis elevados de AGEs e várias evidências apontam que o seu aumento, juntamente com aumento de estresse oxidativo, são responsáveis pelas complicações no diabetes (YOON et al., 2004; BERG et al., 1997; SHIMOIKE et al., 2000). Uma ampla gama de precursores de AGEs circulantes, como CML, CEL e hidroimidazolona 1 derivada do metilglioxal (MG-H1), foram quantificados no plasma humano em uma faixa nanomolar (THORNALLEY et al., 2003). Essas observações sugerem que os níveis circulantes de AGEs refletem parcialmente a hiperglicemia cumulativa e podem ser um biomarcador para prever a progressão de complicações no diabetes (TAHARA et al., 2012).

Um teste bem validado para o diagnóstico do diabetes é o de HbA1c, no entanto esta pode não ser considerada um biomarcador preciso das complicações diabéticas, já que a HbA1c representa apenas o nível médio da glicemia nos últimos 3 meses, e não a exposição a longo prazo, além de não fornecer informações sobre a variabilidade nos níveis de glicose no sangue (SIMÓ-SERVAT et al., 2018). Como os AGEs têm sido associados ao metabolismo de longo prazo e sua avaliação leva em consideração a exposição cumulativa à glicemia e variabilidade glicêmica, estes superam as limitações de HbA1c como biomarcador de diabetes (CERIELLO, IHNAT e THORPE, 2009; WATANABE et al., 2017).

O nível de glicose plasmática é considerado o padrão ouro no diagnóstico do DM mas pode ser um método invasivo e doloroso para o indivíduo, levando à ansiedade e risco de infecção, e requer um profissional habilitado para a realização do exame (SMRITI et al., 2016). Assim sendo, apesar da maioria das

técnicas de diagnóstico laboratorial requererem a análise de sangue, outros fluidos biológicos estão sendo utilizados como alternativa para diagnóstico de muitas doenças, e destes, a saliva oferece vantagens peculiares (BALAN et al., 2014). Para um diagnóstico e monitoramento não invasivo de doenças locais e gerais, a utilização da saliva como fluido biológico, é um método de amostragem muito simples, acessível, fácil de coletar, indolor, permanentemente disponível e amostras podem ser coletadas repetidas vezes, diferentemente da coleta de sangue, tornando este método bastante atraente (BĂBȚAN et al., 2019; HASSANEEN e MARON, 2017).

### **1.7. Saliva**

A saliva é uma secreção glandular e um fluido complexo composto por aproximadamente 99% de água e uma variedade de componentes como proteínas, enzimas, glicose e hormônios em um gradiente comparável ao soro (ZOLOTUKHIN, 2013; KAUFMAN e LAMSTER, 2002; MANDEL e WOTMAN, 1976; HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001). É sintetizada e secretada pelas glândulas salivares, que são inervadas pelo sistema nervoso autônomo. As glândulas salivares podem ser divididas em: maiores (parótidas, submandibular e sublingual) e menores (labial, bucal, lingual e palatal), sendo as maiores responsáveis por cerca de 90% da produção do fluido total (LAWRENCE, 2002; AMANO et al., 2012). Contém uma grande variedade de proteínas, muitas das quais possuem funções biológicas distintas para manter a homeostase da cavidade oral (HU, LOO e WONG, 2007). As proteínas salivares secretadas pelas glândulas incluem a  $\alpha$ -amilase, mucinas, proteínas ricas em prolina, aglutininas, histatinas, cistatinas, lisozimas e glicoproteínas (HUMPHREY e WILLIAMSON, 2001; BENN e THOMSON, 2014). Várias substâncias circulantes no sangue podem se difundir na saliva em concentrações menores (OLIVEIRA, 2010 e DIAZ GÓMEZ, 2011). Acredita-se que a saliva contenha as informações presentes no sangue (DNA, proteínas, hormônios, metabólitos e efetores imunológicos) devido à fina camada epitelial que separa os dutos salivares da circulação sistêmica, facilitando, assim, a troca de substâncias entre o plasma e a saliva (WONG, 2006; MALAMUD, 1992; LÓPEZ DEL VALLE e OCASIO-LÓPEZ, 2011). Nos últimos anos a saliva tem sido bastante utilizada para

diagnóstico e monitoramento de proteínas no organismo (ZHANG et al., 2013). Alguns estudos das proteínas e dos componentes salivares, já permitiram identificar variações entre os estados de saúde normais e de doença (SAKIHARA et al., 2010; HU et al., 2007; RAO et al., 2010). Nos diabéticos a saliva apresenta múltiplas alterações em seus componentes como níveis de glicose, peroxidases e proteínas, a taxa de fluxo, a capacidade de tamponamento, viscosidade e composição iônica eletrolítica, o que pode favorecer o diagnóstico do diabetes (BABU et al., 2014; DODDS, YEH e JOHNSON, 2000; MATA et al., 2004).

O monitoramento do status individual de AGEs em indivíduos saudáveis ou diabéticos pode ser uma ferramenta potente para retardar o início e desenvolvimento da doença crônica (PERRONE et al, 2020). Nos últimos anos a saliva tem sido bastante utilizada para diagnóstico e monitoramento de proteínas no organismo e estudos demonstraram níveis elevados de AGEs na saliva de pacientes portadores de doenças como diabetes tipo 2 e esclerose múltipla (ZHANG et al., 2013; KARLÍK et al., 2015; GARAY-SEVILLA et al., 2005). Outros biomarcadores mensurados na saliva também podem apresentar alterações em diabéticos. Os níveis de  $\alpha$ -2-macroglobulina, um inibidor endógeno de proteases, parecem ser mais elevados no sangue e na saliva de pacientes com DM, visto que a sua síntese é induzida por citocinas (TAKADA et al. 2013). Resultados de um estudo sugeriram que os níveis de zinco salivar também podem atuar como um bom marcador do DM tipo 2, devido à sua função de co-marcador da insulina e sua relação com o metabolismo dos carboidratos (MARTÍNEZ, PAGÁN e JORNET, 2018). E ainda, foram identificados níveis diminuídos de melatonina salivar em grupos diabéticos, em resposta à hiperinsulinemia, que exerce efeito inibitório sobre a glândula pineal, secretora deste hormônio (ABDOLSAMADI et al., 2014). Dessa forma, este fluido biológico é bem estabelecido para classificar indivíduos diabéticos e não diabéticos, a partir de abordagens não invasivas de avaliação de biomarcadores na saliva e pode abrir novas e futuras áreas de pesquisa para a detecção em tempo real de vários parâmetros (RAO et al., 2009; BĂBȚAN et al., 2019).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Realizar ensaio de glicação de saliva e proteínas *in vitro* para identificar alterações causadas por AGEs que possam ser analisadas e utilizadas como método de diagnóstico do diabetes mellitus.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Analisar a intensidade de fluorescência das amostras de proteínas e de saliva controle e glicadas;
- Verificar a atividade da enzima  $\alpha$ -amilase salivar após glicação;
- Quantificar nas amostras os danos oxidativos causados pelos AGEs pelos métodos de dosagem de proteína carbonilada e grupos tiol livres;
- Determinar o perfil proteico das amostras por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS;
- Realizar *Western Blotting* para imunodeteção de  $\alpha$ -amilase salivar glicada;
- Avaliar o perfil das amostras por espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR).

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Voluntários**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (parecer número: 4.466.521). Para este estudo, amostras de saliva foram coletadas de 12 indivíduos, sendo 6 homens e 6 mulheres, com idade entre 18 e 40 anos e saudáveis, sem apresentar qualquer tipo de patologia durante o período de participação no estudo. Este número de voluntários foi determinado de acordo com dados da

literatura envolvendo análises de saliva (KALLITHRAKA, BAKKER E CLIFFORD, 1998; JOUBERT, 2017; LANE e HACKNEY, 2015). Após se enquadrarem aos critérios de inclusão e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os voluntários realizaram a coleta de saliva. 4 indivíduos realizaram uma coleta de saliva a mais, para obtenção de alfa-amilase salivar purificada.

### **3.1.1. Critérios de inclusão**

- Idade entre 18 e 40 anos;
- Indivíduo saudável.

### **3.1.2. Critérios de exclusão**

- Patologias no período da coleta;
- Não ter seguido as orientações de higiene bucal no momento da coleta;
- Ter ingerido alimentos ou bebidas nos 30 minutos precedentes à coleta.

## **3.2. Coleta e processamento da saliva**

A coleta de saliva foi realizada em um único dia no período da manhã (08:00 às 12:00) a fim de se garantir as mesmas condições para todos os voluntários. Cada voluntário recebeu seu tubo para a coleta, que foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia, campus Umuarama.

A saliva de 12 voluntários foi coletada pelo método de cuspe, segundo Navazesh (1993), sem estimulação mecânica em tubos cônicos plásticos tipo Falcon (50 mL). Os voluntários foram instruídos a não ingerirem alimentos ou qualquer tipo de bebida por pelo menos 30 minutos antes da coleta. Imediatamente antes de coletarem, os voluntários enxaguaram a boca com água destilada para a limpeza de “debris” celulares e, em seguida, eles cuspiram aproximadamente 30 mL de saliva dentro do tubo. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min a 4°C para a obtenção do

sobrenadante, e então, armazenadas a -80°C. Posteriormente, estas amostras congeladas foram liofilizadas, e então, novamente armazenadas a -80°C até o momento das análises.

### **3.3. Purificação da alfa-amilase salivar**

#### **3.3.1. Coleta e preparo da amostra de saliva**

Para obtenção da alfa-amilase salivar purificada, foram coletadas amostras de saliva de quatro indivíduos, seguindo o mesmo protocolo de coleta explicitado no tópico anterior. A saliva coletada dos quatro voluntários (aproximadamente 80mL) foi reunida e centrifugada a 12000g por 12 minutos a 4°C. O sobrenadante foi diluído 1:1 (v/v) em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0, contendo 10mM de EGTA e 10mM de EDTA e azida sódica à 0,2%.

#### **3.3.2. Cromatografia de troca iônica em coluna de Q-Sepharose e diálise**

Para realização da cromatografia de troca iônica foi utilizada uma coluna de vidro com 9cm de altura x 2cm de diâmetro, empacotada com 63mL da resina Q-Sepharose fast flow. A coluna foi equilibrada com cinco volumes de Tris-HCl 25mM pH 8,0, contendo 5mM de EGTA e 5mM de EDTA e azida sódica à 0,2%. Aplicou-se o volume de 160mL da amostra de saliva diluída na coluna. O volume coletado foi dialisado em bicarbonato de amônio 50mM, liofilizados e armazenados em congelador para análises posteriores.

### **3.4. Ensaio de glicação**

#### **3.4.1. Modelo BSA – frutose**

O ensaio de glicação utilizando o modelo BSA (bovine serum albumin) – frutose (Sigma, St Louis, MO, USA) foi adaptado de acordo com Franco, *et al.* (2018). Amostras contendo 50mg/ml de BSA e 1,25M de frutose (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem frutose foram incubadas sob as mesmas condições, sendo a frutose substituída por tampão



fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato. Para análise de espectroscopia ATR-FTIR, o pellet foi ressuspensionado em água e liofilizado.

#### **3.4.2. Modelo BSA – metilglioxal**

O ensaio de glicação utilizando o modelo BSA – metilglioxal (Sigma, St Louis, MO, USA) foi adaptado de acordo com Justino, *et al.* (2018). Amostras contendo 50mg/ml de BSA e 53,3mM de metilglioxal (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem metilglioxal foram incubadas sob as mesmas condições, sendo o metilglioxal substituído por tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato. Para análise de espectroscopia ATR-FTIR, o pellet foi ressuspensionado em água e liofilizado.

#### **3.4.3. Modelo lisozima – frutose**

Amostras contendo 10mg/ml de lisozima da clara do ovo de galinha (Sigma, St Louis, MO, USA) e 1,25M de frutose (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem frutose foram incubadas sob as mesmas condições, sendo a frutose substituída por tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato. Para análise de espectroscopia ATR-FTIR, o pellet foi ressuspensionado em água e liofilizado.

#### **3.4.4. Modelo lisozima – metilglioxal**

Amostras contendo 10mg/ml de lisozima da clara do ovo de galinha e 53,3mM de metilglioxal (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras

controle sem metilglioxal foram incubadas sob as mesmas condições, sendo o metilglioxal substituído por tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em tampão fosfato. Para análise de espectroscopia ATR-FTIR, o pellet foi ressuscitado em água e liofilizado.

#### **3.4.5. Modelo saliva – frutose**

Amostras contendo 50mg/ml de saliva e 1,25M de frutose (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem frutose foram incubadas sob as mesmas condições, sendo a frutose substituída por tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em tampão fosfato. Para análise de espectroscopia ATR-FTIR, o pellet foi ressuscitado em água e liofilizado.

#### **3.4.6. Modelo saliva – metilglioxal**

Amostras contendo 50mg/ml de saliva e 53,3mM de metilglioxal (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem metilglioxal foram incubadas sob as mesmas condições, sendo o metilglioxal substituído por tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em tampão fosfato. Para análise de espectroscopia ATR-FTIR, o pellet foi ressuscitado em água e liofilizado.

#### **3.4.7. Modelo alfa-amilase salivar – frutose**

Amostras contendo 10mg/ml de alfa-amilase salivar e 1,25M de frutose (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem frutose foram incubadas sob as mesmas condições, sendo a frutose substituída por

tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato.

#### **3.4.8. Modelo alfa-amilase salivar – metilglioxal**

Amostras contendo 10mg/ml de alfa-amilase salivar e 53,3mM de metilglioxal (diluídos em 200mM de tampão fosfato, pH 7,4 contendo 0,02% de azida sódica) foram incubadas no escuro a 37°C por 21 dias. Amostras controle sem metilglioxal foram incubadas sob as mesmas condições, sendo o metilglioxal substituído por tampão fosfato. Após o período de incubação, foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 20% nas amostras, que foram, então, centrifugadas a 10000g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em tampão fosfato.

### **3.5. Métodos de análises**

#### **3.5.1. Intensidade de fluorescência**

A intensidade de fluorescência foi mensurada utilizando-se um espectrofluorímetro com excitação a 350nm e emissão a 420nm (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, USA).

#### **3.5.2. Atividade da alfa-amilase salivar**

Para determinar a atividade da alfa-amilase salivar após glicação, foi utilizado um ensaio cinético colorimétrico. O método baseia-se na hidrólise do substrato 2-cloro-4-nitrofenil-4-β-D-galactopiranosilmaltosídeo (GalG2CNP), pela alfa-amilase, liberando 2-cloro-4-nitrofenil (CNP), que é quantificado fotometricamente a 405nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). A atividade da alfa-amilase é diretamente proporcional ao aumento da absorbância. As amostras de alfa-amilase salivar foram diluídas em tampão MES (MES 50mM, NaCl 300mM, CaCl<sub>2</sub> 11 5mM, KSCN 140mM, pH 6,3), seguido pela adição do substrato GALG2CNP, e então, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (VersaMax, Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA),

durante 3 minutos a 37°C, com intervalo de 1 minuto entre cada leitura (GRANGER et al., 2007).

### **3.5.3. Medição de grupos carbonila e tióis ligados a proteínas**

As carbonilas nas amostras controle e glicadas foram identificadas pela dinitrofenilhidrazina (DNPH), precipitadas com TCA 20%, lavadas com etanol-acetato de etila e dissolvidas em 6mol L<sup>-1</sup> de cloridrato de guanidina (JUSTINO et al., 2019). Os valores de absorvância foram registrados a 370nm (VersaMax, Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) e o conteúdo de carbonilas foi calculado utilizando uma absorvância molar de 22,000mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>; os resultados foram expressos como a proporção de nmol de DNPH reagido.

O conteúdo de tióis livres foi determinado nas amostras controle e glicadas de acordo com um método estabelecido utilizando 5,5'-ditiobisnitrobenzóico (DTNB) (ELLMAN,1959). A concentração de tiol livre foi calculada utilizando 14,150mol L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> como coeficiente de extinção molar do DTNB. Foi realizada leitura em espectrofotômetro a 412nm (VersaMax, Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA).

### **3.5.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)**

As amostras após glicação foram solubilizadas em tampão de amostra de eletroforese (1:10) (Tris-HCl 31,2mM, SDS 8,75%, sacarose 20%, β-mercaptoetanol 10%, EGTA-K 11mM e bromofenol blue 0,25%), e então, submetidas à eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio – poliacrilamida para análise do perfil proteico, utilizando géis 12%, conforme descrito em Elostá et al. (2017). Amostras contendo 5µg de proteínas, mensuradas pelo método de Bradford (1976), foram aplicadas nos géis e corridas a 35mA em tampão eletrodo. Após a corrida esses géis foram corados com azul de Comassie, descorados em solução descorante e então fotografados (Amersham Imager 600 system, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

### **3.5.5. Western Blotting**

Alíquotas das amostras de saliva foram solubilizadas em tampão de amostra de eletroforese. 5µg de proteínas de cada amostra foram submetidas à eletroforese. As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão Tris-glicina (TOWBIN, STAEHELIN e GORDON, 1992). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T e lavadas 3 vezes (2 vezes por 5 minutos e 1 vez por 10 minutos) com PBS-T. Depois de bloqueadas e lavadas as membranas foram incubadas por período overnight com anticorpo primário anti-amilase, em seguida foi feita a lavagem (2 vezes por 5 minutos e 1 vez por 10 minutos) com PBS-T. As membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit, e novamente realizada a lavagem com PBS-T. Os anticorpos ligados às membranas foram visualizados por quimioluminescência e os resultados foram expressos por densitometria (Amersham Imager 600 system, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden).

### **3.5.6. Espectroscopia de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR)**

As análises dos espectros de infravermelho foram adquiridas utilizando o espectrofotômetro ATR-FTR Vertex 70 (Bruker Optics, Reinstetten, Germany) acoplado ao componente de reflectância total atenuada (ATR). O material de cristal na unidade ATR utilizado foi um disco de diamante como elemento de reflexão interno. Os espectros das amostras liofilizadas foram registrados em triplicata. Antes de cada análise da amostra, o espectro do ar foi utilizado como background. Os espectros foram obtidos em uma sala com temperatura entre 22–23 °C, resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e foram realizados 32 scans.

No processamento das amostras, a linha de base foi corrigida e normalizada pelo vetor antes de realizar as análises. A região de 1800-900 cm<sup>-1</sup> dos espectros de todas as amostras foi utilizada como dados de entrada para a técnica multivariada de análise de componentes principais (PCA). Todas as etapas de pré-processamento e análise espectral foram realizadas com Origin Pro 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, United States).

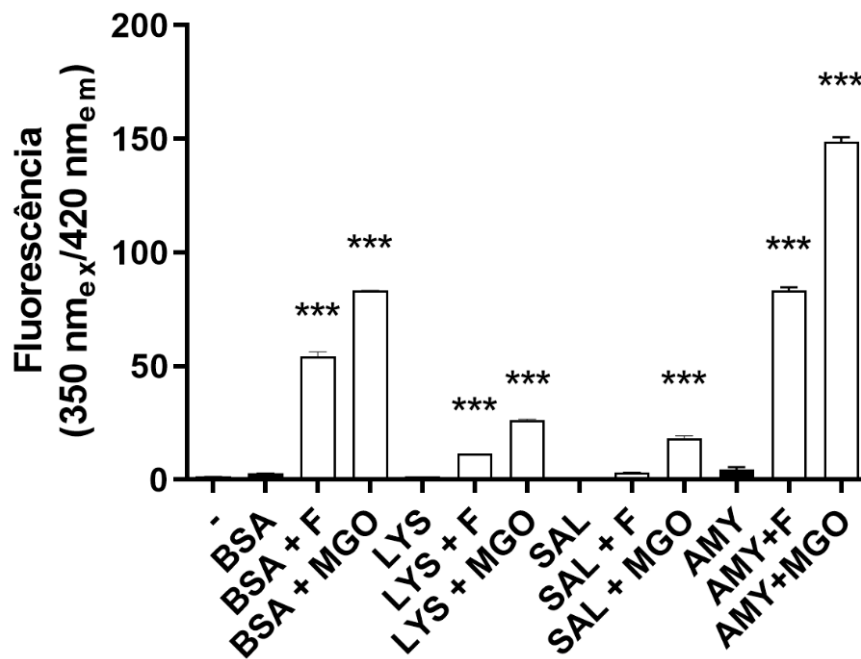
### **3.6. Análises estatísticas**

As análises estatísticas e gráficos foram feitos no software GraphPad Prism 6.0. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A significância da diferença foi calculada utilizando ANOVA one-way ou two-way, e pós-testes de Tukey e Dunnett's para múltiplas comparações. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Intensidade de fluorescência**

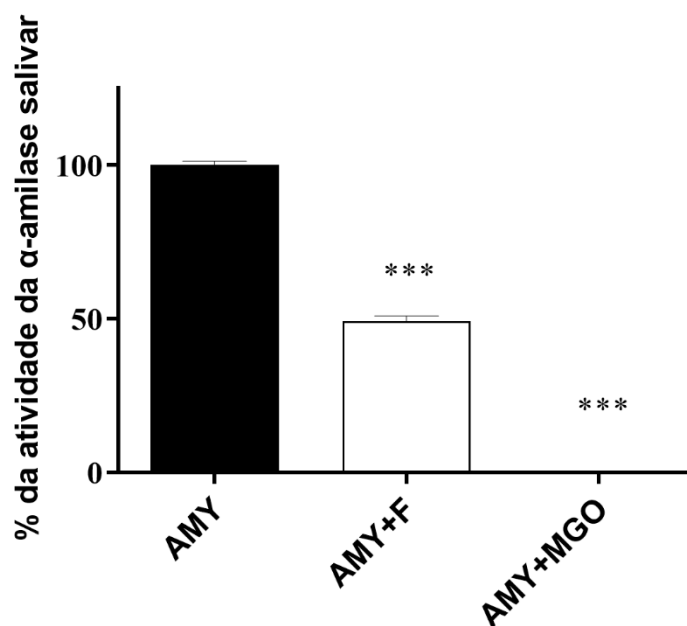
A intensidade de fluorescência das proteínas BSA, lisozima e da saliva quando glicadas por 21 dias pela frutose e metilglioxal está representada na figura 4. Foi observado um aumento significativo da intensidade de fluorescência de aproximadamente 51% para o BSA glicado com frutose e de 80% para o BSA glicado com metilglioxal, em relação ao BSA puro. Um aumento significativo na intensidade de fluorescência também foi observado na lisozima, sendo de aproximadamente 10% para lisozima glicada com frutose e 26% para lisozima glicada com metilglioxal, quando comparados com a lisozima pura. Já na saliva, houve um aumento significativo apenas para a saliva glicada com metilglioxal em relação à saliva pura, sendo este de aproximadamente 17%. A intensidade de fluorescência da  $\alpha$ -amilase salivar quando glicada por 21 dias pela frutose e metilglioxal está representada na figura 4. Foi observado um aumento significativo da intensidade de fluorescência para a  $\alpha$ -amilase salivar glicada com frutose (83,3) e com metilglioxal (148,8), em relação à enzima pura



**Figura 4.** Intensidade de fluorescência do BSA (50mg/ml), lisozima (10mg/ml), saliva (50mg/ml) e  $\alpha$ -amilase salivar (10mg/ml) na presença de frutose (1,25M) ou metilglioxal (53,3mM), após 21 dias incubados a 37°C. \*\*\* p < 0,001

#### 4.2. Atividade da alfa-amilase salivar

A figura 5 indica a atividade da  $\alpha$ -amilase salivar na presença de frutose e metilglioxal após período de 21 dias de incubação. O resultado mostra uma diminuição significativa na atividade desta enzima, tanto para a amilase glicada com frutose (49%), quanto para a amilase glicada para o metilglioxal (0,2%).

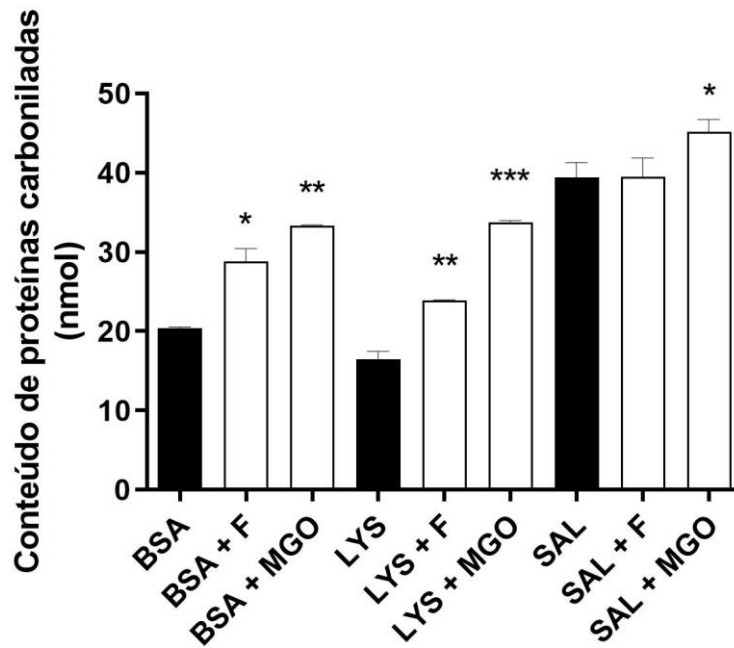


**Figura 5.** Atividade da α-amilase salivar na presença de frutose (1,25M) e metilglioxal (53,3mM), após 21 dias incubados a 37°C. \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.3. Proteína carbonilada

Na figura 6 está representado o conteúdo de proteínas carboniladas em BSA, lisozima e saliva após 21 dias de incubação com frutose e metilglioxal. Observou-se aumento significativo de proteínas carboniladas de aproximadamente 8% no BSA glicado com frutose e de 13% no BSA glicado com metilglioxal, quando comparados ao BSA puro. Também foi observado aumento significativo na lisozima na presença de frutose (aproximadamente 7%) e na presença de metilglioxal (aproximadamente 17%) em relação à lisozima pura. Nas amostras de saliva, apenas salivas glicadas com metilglioxal apresentaram diferença significativa em relação à saliva pura, aumentando em aproximadamente 6% o conteúdo de proteínas carboniladas.

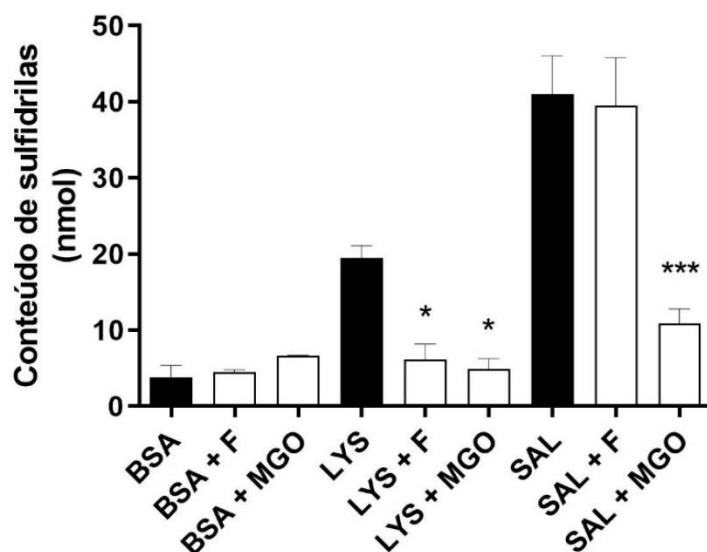




**Figura 6.** Conteúdo de proteínas carboniladas (nmol) em BSA (50mg/ml), lisozima (10mg/ml) e saliva (50mg/ml) na presença de frutose (1,25M) ou metilglioxal (53,3mM), após 21 dias incubados a 37°C. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.4. Grupos tióis

O conteúdo de grupos tióis livres em BSA, lisozima e saliva após serem glicosados com frutose e metilglioxal está representado na figura 7. Para o BSA não houve diferença significativa tanto na presença de frutose quanto de metilglioxal em relação ao BSA puro. Já com a lisozima, foi observada uma diminuição significativa de aproximadamente 13% e 14% no conteúdo de tióis, na presença de frutose e metilglioxal, respectivamente, em comparação com a lisozima pura. Na saliva, apenas a saliva glicada com metilglioxal apresentou diminuição significativa no conteúdo de tióis (aproximadamente 30%) quando comparada à saliva pura.

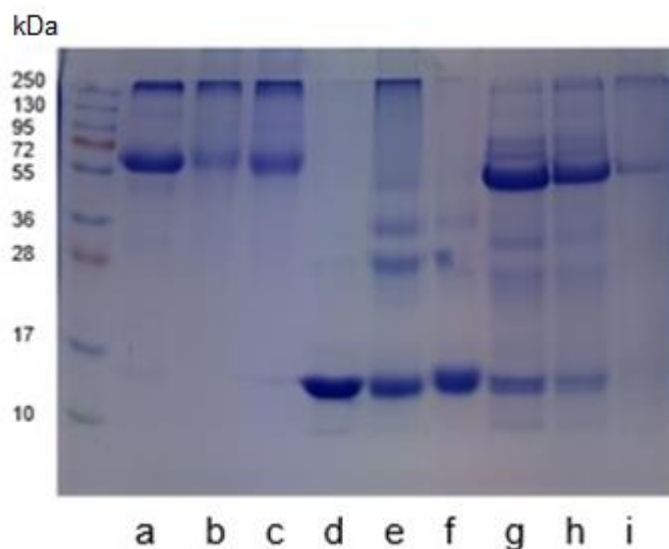


**Figura 7.** Conteúdo de sulfidrilas (nmol) em BSA (50mg/ml), lisozima (10mg/ml) e saliva (50mg/ml) na presença de frutose (1,25M) ou metilglioxal (53,3mM), após 21 dias incubados a 37°C. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.5. SDS-PAGE

Na figura 8 contém a eletroforese em SDS-PAGE 12% representando o perfil proteico do BSA, lisozima e saliva submetidos à glicação com frutose e metilglioxal por 21 dias. Na faixa a, contendo o BSA puro, observa-se uma banda principal de alta intensidade com peso molecular em torno de 66kDa. Essa banda diminui a intensidade quando o BSA é glicado com frutose (faixa b) e metilglioxal (faixa c). Além disso, é possível detectar uma banda de aproximadamente 95 kDa no BSA com MGO (faixa c). Na faixa d, a banda principal com alta intensidade é referente à lisozima pura, com peso molecular de aproximadamente 14 kDa. Quando a lisozima foi glicada com frutose (faixa e) e metilglioxal (faixa f), a intensidade dessa banda foi diminuída e além disso, observa-se a formação de ligações cruzadas, que se apresentam como dímeros, indicados pelo surgimento bandas com massa molecular relativa ( $M_r$ ) próximas de 28, 36 e 55 kDa, quando comparados à lisozima pura. A faixa g representa o perfil proteico de uma amostra de saliva pura, indicando bandas de maior intensidade próximas de  $M_r$  56 e 14 kDa, referentes à alfa-amilase e lisozima presentes na saliva, respectivamente. Foi observado uma diminuição na

intensidade dessas bandas principais quando a saliva foi glicada com frutose (faixa h) e metilglioxal (i).

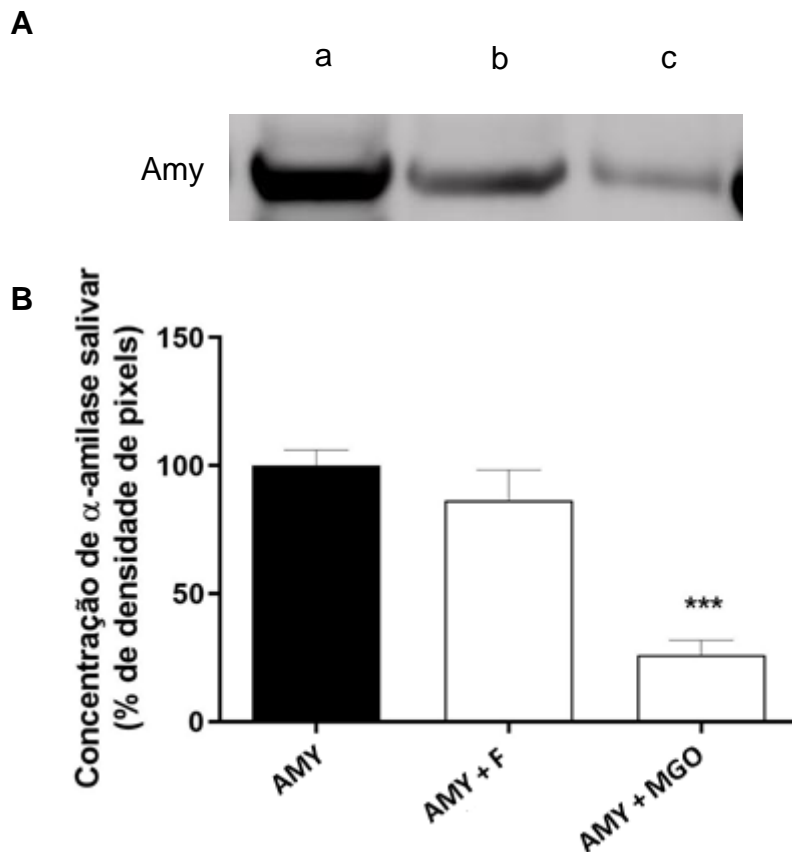


**Figura 8.** Perfil proteico (SDS-PAGE) após glicação de BSA, lisozima e saliva pela frutose e MGO. Faixa a: BSA puro; b: BSA+frutose; c: BSA+MGO; d: lisozima pura; e: lisozima+frutose; f: lisozima+MGO; g: saliva pura; h: saliva+frutose; i: saliva+MGO.

#### 4.6. Western Blotting

*Western Blotting* foi realizado para analisar a expressão da  $\alpha$ -amilase salivar após glicação de saliva com frutose e metilglioxal. Na figura 9A estão representadas as expressões de  $\alpha$ -amilase salivar (Mr 55kDa) nas amostras de  $\alpha$ -amilase não glicada (bandas a),  $\alpha$ -amilase glicada com frutose (bandas b) e  $\alpha$ -amilase glicada com metilglioxal (bandas c). É possível observar a diminuição na intensidade da  $\alpha$ -amilase salivar quando glicadas com a frutose e metilglioxal, sendo essa redução mais acentuada na glicação da saliva com metilglioxal.

A figura 9B representa a concentração de  $\alpha$ -amilase salivar, dada em % de densidade de pixels, após imunodeteção para  $\alpha$ -amilase. Foi verificada diferença significativa na concentração da  $\alpha$ -amilase glicada com metilglioxal, sendo esta uma redução de aproximadamente 74%, quando comparada. Essa diferença não foi observada na  $\alpha$ -amilase glicada com frutose.

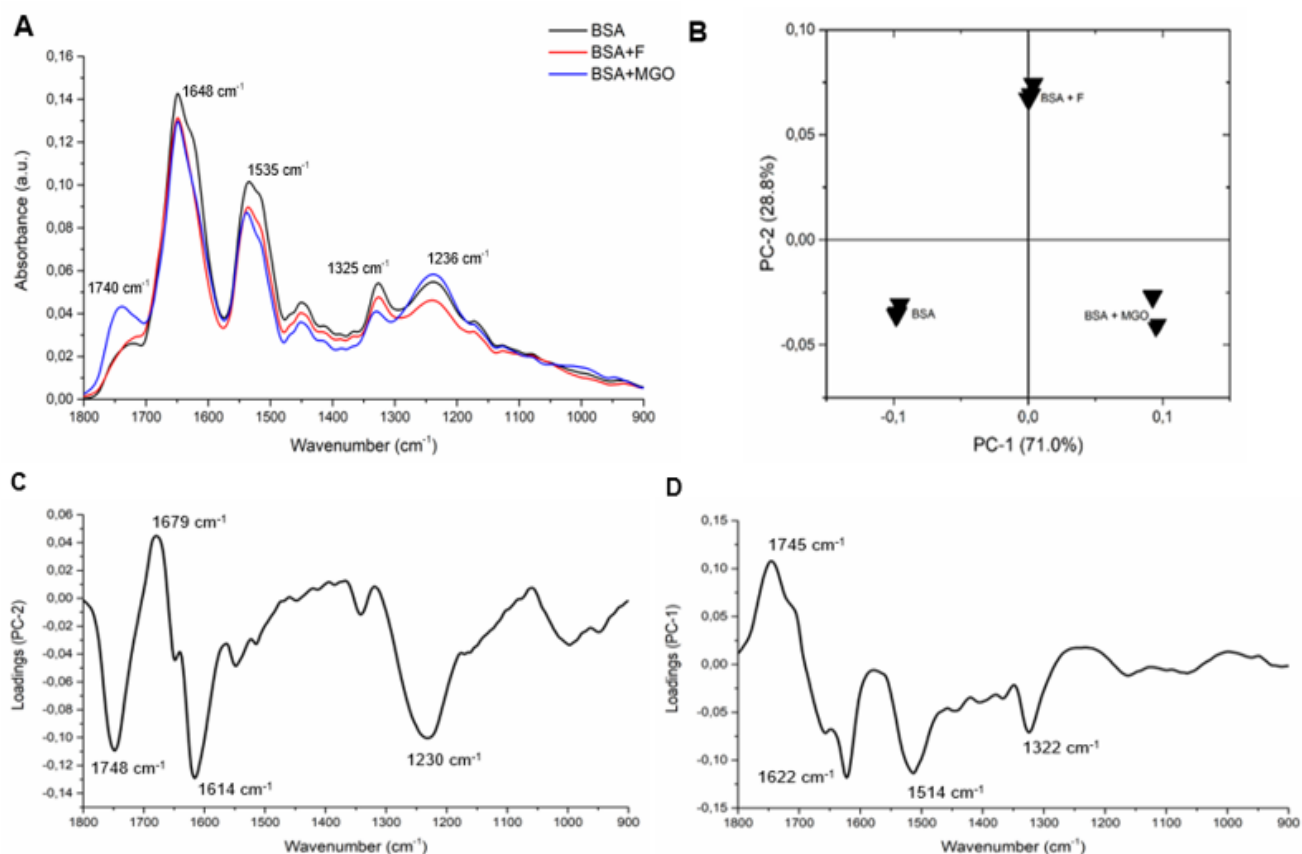


**Figura 9. A** - Western Blot da  $\alpha$ -amilase salivar após glicação das amostras de saliva. Banda a: saliva pura; b: saliva+frutose; c: saliva+MGO. **B** - Concentração de  $\alpha$ -amilase salivar (AMY) (% de densidade de pixels) após imunodeteção da  $\alpha$ -amilase. \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.7. ATR-FTIR

O perfil médio dos espectros das amostras de BSA, BSA+F e BSA+MGO está representado na figura 10A. As principais bandas de destaque do espectro da glicação do BSA com frutose e MGO são os modos vibracionais em  $1740\text{ cm}^{-1}$ ,  $1648\text{ cm}^{-1}$ ,  $1535\text{ cm}^{-1}$ ,  $1325\text{ cm}^{-1}$ ,  $1236\text{ cm}^{-1}$ . No geral, estes picos vibracionais representam componentes de estruturas principalmente relacionadas a proteínas. Com a finalidade de avaliar a separação específica relacionado ao processo de glicação com frutose e MGO, as amostras foram submetidas à análise de PCA. Foi observado no gráfico de escores de PCA (Figura 10B) uma separação clara entre as amostras. A porcentagem de variância explicada pelas duas primeiras PC em conjunto foi de 99,8%. O gráfico de escores da PC1 x PC2

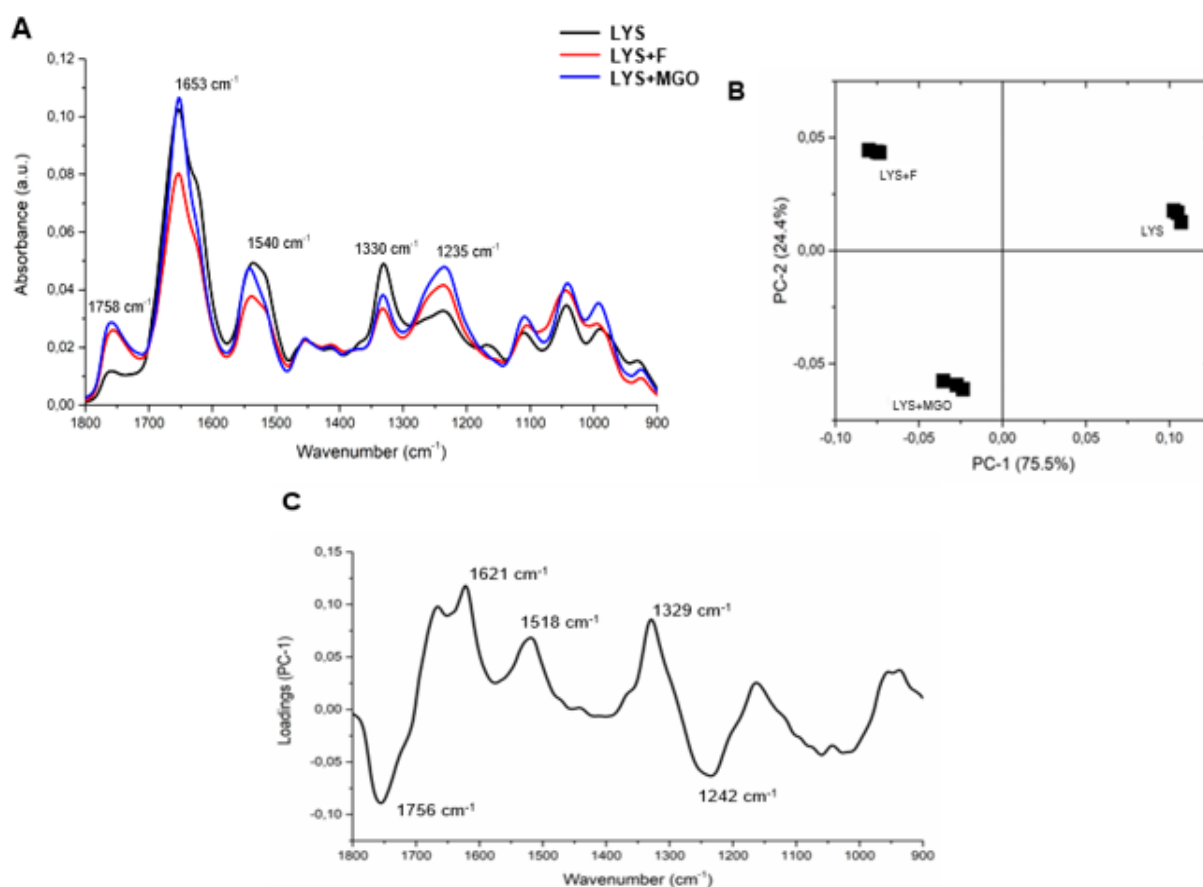
evidenciou a formação de agrupamentos distintos entre as três condições de BSA. Neste gráfico, a PC-1 foi responsável pela distinção entre BSA (lado negativo do eixo PC-1) e BSA+MGO (lado positivo do eixo PC-1); e a PC-2 responsável pela diferenciação entre BSA (lado negativo do eixo PC-2) e BSA+F (lado positivo do eixo PC-2). Os gráficos de carregamentos (Figuras 10C e 10D) destacam as principais variáveis responsáveis pela formação do agrupamento observado entre as amostras. Em relação ao processo de glicação pela frutose, os principais picos que representam a diferenciação com BSA puro são  $1748\text{ cm}^{-1}$ ,  $1679\text{ cm}^{-1}$ ,  $1614\text{ cm}^{-1}$  e  $1230\text{ cm}^{-1}$  (Figura 10C). Carregamentos negativos dos modos vibracionais indicam maiores níveis dos picos de  $1748\text{ cm}^{-1}$ ,  $1614\text{ cm}^{-1}$  e  $1230\text{ cm}^{-1}$  em BSA e carregamento positivo indica maior nível do pico  $1679\text{ cm}^{-1}$  em BSA+F. Já os principais picos que contribuem para a diferenciação do processo de glicação com MGO e BSA puro são os picos  $1745\text{ cm}^{-1}$ ,  $1622\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$ , e  $1322\text{ cm}^{-1}$  (Figura 10D). Carregamentos negativos dos modos vibracionais indicam maiores níveis dos picos de  $1622\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$ , e  $1322\text{ cm}^{-1}$  em BSA e carregamento positivo indica maior nível do pico  $1745\text{ cm}^{-1}$  em BSA+MGO.



**Figura 10.** **A** - Espectro médio de ATR-FTIR (1800 – 900  $\text{cm}^{-1}$ ) nas amostras de BSA, BSA glicado com frutose (BSA+F) e BSA glicado com metilgloxal (BSA+MGO); **B** - Escores de PCA realizado no espectro de BSA; **C** – Carregamentos correspondentes ao PCA em BSA e BSA+F; **D** - Carregamento correspondentes ao PCA em BSA e BSA+MGO.

Em relação ao processo de glicação da lisozima pela frutose e MGO, o perfil médio é representado na figura 11A. As principais bandas de destaque do espectro da glicação da lisozima com frutose e MGO são os modos vibracionais em  $1758 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1653 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1540 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1330 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1235 \text{ cm}^{-1}$ . Assim como observado na análise de BSA, estes modos vibracionais representam componentes de estruturas principalmente relacionados a proteínas. A figura 11B representa a formação de agrupamentos claros entre as amostras devido ao processo de glicação da lisozima. A porcentagem de variância total explicada pelas duas primeiras PC foi de 99,9%. A PC-1 foi responsável pela distinção entre as duas condições de glicação, tanto LYS e LYS+F, e LYS e LYS+MGO. Os principais picos que representam essa diferenciação com a lisozima pura são  $1756 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1621 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1518 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1329 \text{ cm}^{-1}$  e  $1242 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 11C). Carregamentos positivos dos modos vibracionais indicam maiores níveis dos

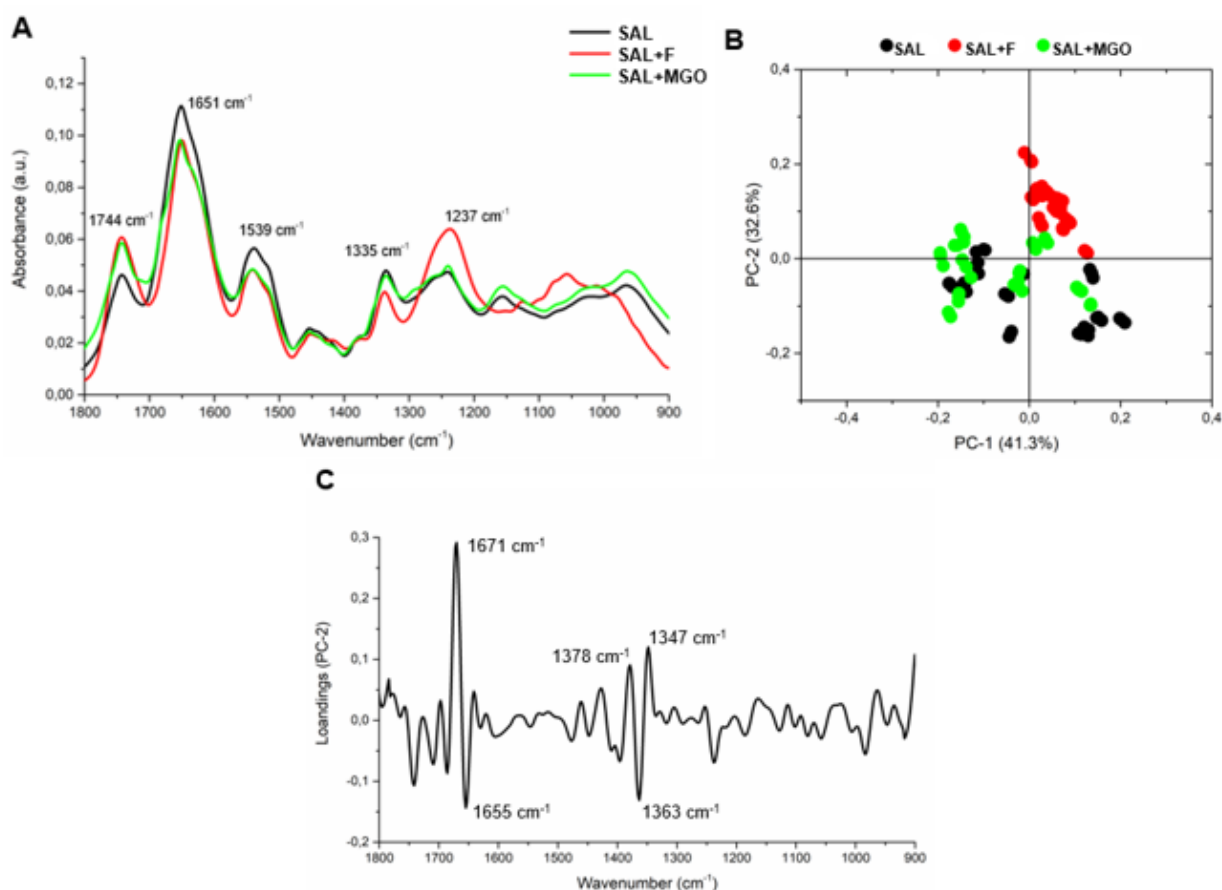
picos de  $1621\text{ cm}^{-1}$ ,  $1514\text{ cm}^{-1}$  e  $1329\text{ cm}^{-1}$  em LYS e carregamentos negativos indicam maiores níveis dos picos  $1756\text{ cm}^{-1}$  e  $1242\text{ cm}^{-1}$  em LYS+F e LYS+MGO.



**Figura 11.** **A** - Espectro médio de ATR-FTIR ( $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$ ) nas amostras de lisozima (LYS), lisozima glicada com frutose (LYS+F) e lisozima glicada com metilglioxal (LYS+MGO); **B** - Escores de PCA realizado no espectro da lisozima; **C** - Carregamentos correspondentes ao PCA em LYS com LYS+F e LYS+MGO.

A figura 12A representa o perfil médio espectral da saliva e a glicação com frutose e MGO. Os principais picos de destaque são os modos vibracionais em  $1744\text{ cm}^{-1}$ ,  $1651\text{ cm}^{-1}$ ,  $1539\text{ cm}^{-1}$ ,  $1335\text{ cm}^{-1}$  e  $1237\text{ cm}^{-1}$ , que são relacionados a componentes de proteínas. A análise de PCA, representada na Figura 12B, evidencia uma separação clara apenas entre a saliva pura e a saliva com frutose, não sendo possível observar um agrupamento de saliva com MGO. A porcentagem de variância total explicada pelas duas PCs foi de 73,9%. A PC-2 foi a responsável pela distinção entre SAL e SAL+F, uma vez que SAL se encontra na porção inferior e negativa do gráfico e SAL+F na porção superior e positiva. Os principais picos que representam essa diferenciação entre a

glicação com frutose na saliva são  $1671\text{ cm}^{-1}$ ,  $1655\text{ cm}^{-1}$ ,  $1378\text{ cm}^{-1}$ ,  $1363\text{ cm}^{-1}$  e  $1347\text{ cm}^{-1}$ . (Figura 12C). Carregamentos negativos dos modos vibracionais indicam maiores níveis dos picos de  $1655\text{ cm}^{-1}$  e  $1363\text{ cm}^{-1}$  em SAL e carregamentos positivos indicam maiores níveis dos picos  $1671\text{ cm}^{-1}$ ,  $1378\text{ cm}^{-1}$  e  $1347\text{ cm}^{-1}$  em SAL+F.



**Figura 12.** **A** - Espectro médio de ATR-FTIR ( $1800 - 900\text{ cm}^{-1}$ ) nas amostras de saliva pura (SAL), saliva glicada com frutose (SAL+F) e saliva glicada com metilglioxal (SAL+MGO); **B** - Escores de PCA realizado no espectro da saliva; **C** - Carregamentos correspondentes ao PCA em SAL e SAL+F.

## 5. DISCUSSÃO

O estudo de proteínas contendo produtos de glicação em estágio inicial ou AGEs tornaram-se de grande interesse devido à suspeita sobre efeitos da glicação na função das proteínas e danos nos tecidos no diabetes (BARTOSZ et al., 2014). Nesse trabalho foram utilizados como alvos da glicação não



enzimática a saliva e as proteínas BSA, lisozima e  $\alpha$ -amilase salivar. Esses alvos foram submetidos à glicação com frutose e MGO.

Com base nas propriedades de fluorescência foi possível observar aumento na intensidade de fluorescência das proteínas glicadas neste trabalho. O modelo de glicação BSA-frutose apresentou resultado correspondente a estudos que analisaram a fluorescência da glicação *in vitro* do BSA pela frutose (OIMOMI et al., 1989; TAKAGI et al., 1995). Foi demonstrado que a glicação precoce e avançada de BSA pela frutose possui especificidade de local semelhante à da glicose, sendo o resíduo de lisina-524 o principal local de modificação do BSA. Quase toda a perda de lisina no BSA glicado por frutose foi atribuída à formação de CML, que pode ocorrer pela condensação entre os carbonos 1 e 2 da *N*<sup>ε</sup>-(2-deoxiglucose-2-il)-lisina, uma forma de produto de Heyns, seguido pela oxidação de *N*<sup>ε</sup>-(formilmetil)-lisina (HILTON e AMES, 2006). Na glicação do BSA-MGO houve aumento ainda mais acentuado na intensidade de fluorescência, o que está de acordo com resultados encontrados na literatura (SADOWSKA-BARTOSZ, GALINIAK e BARTOSZ, 2014; OU et al., 2017; LIU et al., 2020). As modificações irreversíveis geradas pela glicação de MGO no BSA são altamente seletivas para resíduos de arginina, com algumas modificações de lisina e grupos amino-terminais (CHEUNG e FONDA, 1979). O resultado deste estudo confirma maior reatividade do MGO em relação à frutose. No cenário fisiológico, os sacarídeos são importantes agentes de glicação, mas entre os mais reativos está o metilglioxal, considerado o mais significativo agente de glicação, sendo uma das mais reativas moléculas de dicarbonil nas células vivas (HAVLIKOVA, 2015). *In vivo*, a proporção de albumina glicada em pessoas saudáveis está entre 1 e 10% e essa proporção pode aumentar de duas a três vezes no diabetes (BOURDON, LOREAU e BLACHE, 1999). Muitos estudos mostram que elevadas concentrações de albumina glicada estão associadas a diversas complicações diabéticas, e esta tem sido relatada como um poderoso indicador de controle glicêmico pois sua meia-vida é mais curta do que a HbA1c, representando melhor as variações glicêmicas (HATTORI, 2002; RUGGIERO-LOPEZ, 1997; PEACOCK, 2008).

As intensidades de fluorescência na glicação da lisozima pela frutose e MGO também foram aumentadas, o que coincide com resultados anteriormente encontrados (GHOSH et al., 2013; AHMAD, PISCHETSRIEDER e AHMED,

2007). São considerados os potenciais sítios de glicação da lisozima o grupo  $\alpha$ -amino N-terminal, grupo  $\epsilon$ -amino de resíduos de lisina e grupo guanidino de resíduos de arginina (TAGAMI et al., 2000). O processo de glicação da lisozima resulta em uma redução na função antibacteriana dessa proteína. Tais alterações são um importante fator no aumento da prevalência de infecções bacterianas observadas em pacientes com diabetes (LI, 1998). O MGO é altamente reativo e reage com a lisozima a uma taxa mais elevada do que a glicose, resultando na formação de AGEs reticulados (ALJOHI, MATOU-NASRI e AHMED, 2016). No estudo de Banerjee (2020), a glicação da lisozima da clara do ovo de galinha por diferentes concentrações de MGO foi mensurada pelo espectro de fluorescência, apresentando valores de fluorescência diretamente proporcionais às concentrações de MGO utilizadas. Os AGEs derivados do MGO podem ter sido responsáveis pelas alterações em resíduos de arginina e de lisina da lisozima.

O efeito da glicação da saliva sobre a intensidade de fluorescência gerou aumento significativo apenas na saliva glicada com MGO. Alguns estudos analisaram os compostos de glicação na saliva. Os AGEs foram mensurados por fluorescência na saliva de indivíduos diabéticos e evidenciou uma correlação entre os níveis de AGEs séricos e da saliva. Além disso, os AGEs na saliva aumentaram com a progressão das complicações diabéticas (GARAY-SEVILLA et al., 2005). O MGO reage predominantemente com arginina para formar hidroimidazolona derivada de MGO (MG-H1) e com lisina formando N<sup>ε</sup>-(carboxietil)lisina (MAESSEN, STEHOUWER e SCHALKWIJK, 2015). Manig et al. (2019) sugeriram que os níveis de AGEs na saliva podem ser biomarcadores úteis para avaliação do diabetes, visto que alguns AGEs encontrados na saliva, como CEL, CML e MG-H1, são mais elevados em indivíduos diabéticos. Nakamoto et al. (2003) demonstraram que as proteínas glicadas na saliva possuem correlação com a glicemia e proteínas glicadas no sangue, mais especificamente a HbA1c. Um estudo envolvendo a formação de AGEs em estado hiperglicêmico mostrou que o MGO é considerado o principal precursor de AGEs, podendo levar à inativação de enzimas e desnaturação proteica (SHINOHARA et al., 1998; THORNALLEY e LANGBORG, 1999). A partir de uma quantificação de compostos  $\alpha$ -dicarbonil, foi observada uma maior concentração de MGO na saliva de indivíduos com DM tipo 2 quando comparado a indivíduos

saudáveis (WANG et al., 2019). Portanto, os AGEs formados na saliva a partir da glicação com MGO parecem ter relevância como potenciais biomarcadores do diabetes.

Neste trabalho além da glicação da saliva, foram realizadas também as análises da glicação da  $\alpha$ -amilase salivar purificada. Os resultados de intensidade de fluorescência da  $\alpha$ -amilase salivar aumentaram significativamente quando glicadas tanto com frutose quanto com MGO, o que está em concordância com o resultado da atividade desta enzima, que foi diminuída após a glicação com ambos. Isso indica que os AGEs formados pela ligação desta enzima com frutose e MGO, e mensurados pela fluorescência, podem ter ação inibitória sobre a  $\alpha$ -amilase salivar. Vários estudos que investigaram os níveis de  $\alpha$ -amilase salivar em indivíduos diabéticos e saudáveis, resultaram em redução nos níveis de  $\alpha$ -amilase salivar em diabéticos, corroborando com o resultado deste trabalho (PANCHBHAI, DEGWEKAR e BHOWTE, 2010; INDIRA et al., 2015; NASERI et al., 2018; LIMA-ARAGÃO et al., 2016).

No entanto, estudos que verificaram os níveis de amilase salivar em diabéticos são controversos, alguns mostraram níveis maiores em diabéticos quando comparados a indivíduos saudáveis (LADGOTRA, VERMA e RAJ, 2016; MALATHI, 2013) e outros menores níveis (YAVUZYILMAZ, 1996). Essas diferenças podem ser atribuídas a diferentes níveis de estresse, alterações metabólicas e hormonais associadas a pacientes diabéticos em comparação com indivíduos não-diabéticos (LADGOTRA, VERMA e RAJ, 2016).

O aumento da intensidade de fluorescência gerado pela glicação da frutose sugere a formação dos produtos de Maillard avançados. Na via do polioliol, que tem recebido atenção como um dos fatores etiológicos nas complicações diabéticas, um aumento na concentração de glicose leva a um aumento do sorbitol e posteriormente à formação e acúmulo de frutose nos tecidos (OIMOMI et al., 1989). Portanto, o acúmulo intracelular de frutose em indivíduos diabéticos pode estar associado ao desenvolvimento de suas complicações por meio de modificações de proteína induzida pela frutose, incluindo formação de AGEs ou oxidação de proteínas (TAKAGI et al., 1995). Nos estágios iniciais e intermediários da glicação, os grupos aldeído dos açúcares redutores condensam-se de forma não enzimática com grupos aminos de proteínas,

formando bases de Schiff instáveis e compostos de Amadori. Esses intermediários de glicação podem reagir com espécies reativas de carbonila, como MGO, que são gerados a partir da degradação do açúcar ou do metabolismo celular. A rápida e irreversível reação entre MGO e intermediários de glicação de proteínas leva à formação de AGEs, que podem ser exibidas por absorvância de fluorescência (SCHMITT et al., 2005). Uma vez que o MGO é muito mais reativo do que os açúcares redutores, as glicações induzidas por MGO apresentaram maiores valores na intensidade de fluorescência (LIGGINS e FURTH, 1997).

O processo de glicação é acompanhado pela indução da oxidação de proteínas, que pode levar a alterações em suas estruturas e propriedades biológicas. Tais modificações moleculares podem ser investigadas por formação de proteínas carboniladas e perda de grupos tióis (RAI et al., 2019; MOSSINE et al., 1999). Assim, neste estudo, para análise dos danos oxidativos gerados pela glicação, foram medidas as proteínas carboniladas e grupos tióis livres. A glicação tanto do BSA quanto da lisozima pela frutose e MGO gerou aumento significativo no conteúdo de grupos carbonila, o que está de acordo com resultados encontrados em estudos anteriores (TAKAGI et al., 1995; RAI et al., 2019; ADISAKWATTANA et al., 2012; TARWADI e AGTE, 2011). Na saliva, o aumento na formação de grupos carbonila foi significativo para a glicação com MGO, o que corrobora com o estudo que quantificou a formação de proteína carbonilada na saliva de indivíduos diabéticos e saudáveis, indicando níveis mais elevados em diabéticos (SU et al., 2012). A relação entre diabetes e aumento nos danos oxidativos gerados por grupos carbonila foi comprovada também em análises realizadas no plasma (TELCLI et al., 2000; ODETTI et al., 1999).

O processo de degradação oxidativa dos intermediários de Amadori pode gerar radicais livres. Isso ocorre por meio da formação de intermediários  $\alpha$ -dicarbonil reativos e autooxidação. Assim, radicais hidroxila são formados e degradam as proteínas ao quebrar ligações covalentes ou podem levar à peroxidação lipídica (BOUMA et al., 2003). As proteínas carboniladas são formadas pela oxidação das cadeias laterais das proteínas (principalmente prolina, arginina, lisina e treonina). Os derivados de grupos carbonila também podem ser gerados através da clivagem oxidativa de proteínas pela via de  $\alpha$ -amididação ou por oxidação das cadeias laterais de glutamyl (BERLETT e

STADTMAN, 1997). Elevados níveis de proteína carbonilada estão relacionados com várias doenças, incluindo o DM. Portanto, sua mensuração pode ser um valioso biomarcador da extensão de oxidação das proteínas (TARWADI e AGTE, 2011).

Em contraste com o conteúdo de proteínas carboniladas, as glicações do BSA com frutose e MGO não causaram efeito significativo no conteúdo de grupos tióis, resultado este semelhante ao encontrado em Rai et al. (2019). Já na lisozima glicada com ambos e na saliva glicada com MGO, uma redução significativa do conteúdo de tióis foi observada. A homeostase dinâmica de tiol-dissulfeto desempenha um papel fundamental na proteção antioxidante e esta homeostase envolve funções importantes na transdução de sinais e ajustes na atividade enzimática (BISWAS, CHIDA e RAHMAN, 2006). Em situações de alto estresse oxidativo, os níveis de tiol diminuem para neutralizar as espécies reativas de oxigênio e os grupos sulfidril desempenham um papel importante (GULPAMUK et al., 2018). A etiologia do estresse oxidativo no diabetes não é totalmente esclarecida, mas está relacionada com uma série de mecanismos que incluem a autooxidação da glicose, ação de proteínas glicadas, alterações no balanço redox, redução de compostos antioxidantes como GSH, SOD e catalase (CALDERON et al., 2017).

Durante o processo de glicação de proteínas, intermediários de di-carbonil reativos e derivados de carbonil geram a formação de AGEs e modificam a estrutura proteica, que é propensa à reação oxidativa com aminoácidos como a cisteína, particularmente a cadeia lateral do tiol. Radicais livres gerados na glicação podem oxidar as cadeias laterais de aminoácidos, eliminando os grupos tiol (MIYATA et al., 2000; ZENG et al., 2006). Estudos comprovam que os níveis de grupos tióis são diminuídos em diabéticos em comparação com indivíduos saudáveis, o que leva a um enfraquecimento do sistema de defesa antioxidante e conseqüentemente maior estado de estresse oxidativo (ERGIN et al., 2020; EREN et al., 2019). No presente estudo, o MGO apresentou maior relevância como agente indutor de dano oxidativo mensurado por proteína carbonilada e grupos tióis livres.

A formação de AGEs após glicação do BSA, lisozima e saliva foi sujeita à análise em SDS-PAGE. Em BSA glicado com MGO foi possível observar o aparecimento de uma sutil banda com Mr próximo de 95kDa, correspondendo a

um tripolímero de BSA, que emergiu do BSA glicado, e que sugere a formação de um conjugado de maior peso molecular ou reticulação do BSA induzida pela glicação (ZHANG et al., 2019). Produtos similares foram observados em trabalhos que analisaram a interação do BSA com açúcares redutores (WANG et al., 2011; WU et al., 2009; ZHANG et al., 2019). O perfil eletroforético da lisozima glicada também mostrou a formação de produtos de alto peso molecular na presença de frutose e MGO, caracterizando a lisozima reticulada. Esses produtos representam dímeros, trímeros e tetrâmeros da lisozima glicada, com pesos moleculares de aproximadamente 28, 36 e 55kDa, respectivamente, quando comparados à lisozima pura (~14kDa). Por se tratar de uma proteína com 6 resíduos de lisina e 11 resíduos de arginina, que são alvos de glicação, a lisozima é considerada um bom candidato para modificações de proteínas induzidas pela glicação, que pode ser comprovado neste e em vários estudos, pela extensa reticulação observada nas condições glicadas (TAGAMI et al., 2000; PERERA e HANDUWALAGE, 2015; AHMAD, PISCHETSRIEDER e AHMED, 2007; ALJOHI, MATOU-NASRI e AHMED, 2016; PERERA, PREMADASA e POONGUNRAN, 2016).

Nos últimos anos, o método de SDS-PAGE tem sido bastante utilizado para o estudo das proteínas salivares e muitas já foram identificadas por essa técnica (KHURSHID et al., 2016; VITORINO et al., 2004; HU et al., 2005). Neste trabalho o perfil de eletroforese da saliva revelou a presença de algumas das principais proteínas constituintes deste fluido, sendo as bandas mais intensas referentes à  $\alpha$ -amilase e lisozima, com pesos moleculares de aproximadamente 56 e 14 kDa, respectivamente. Outras bandas de proteínas também foram detectadas neste estudo, de acordo com os pesos moleculares identificados em Gibbins et al. (2014), sendo estes referentes a mucinas (130 a 180 kDa), componentes secretoras de IgA (80 kDa), peroxidases (78 kDa), proteínas ricas em prolina (30 kDa) e cistina (13 kDa). Todas essas bandas proteicas tiveram a intensidade diminuída com a glicação pela frutose e MGO, no entanto, a formação de prováveis bandas que confirmariam a reticulação proteica não foram observadas pela eletroforese. Uma possibilidade que explica este resultado é a grande heterogeneidade de compostos presentes no fluido salivar, dificultando a detecção específica de AGEs. Não há na literatura estudos que

verifiquem em SDS-PAGE a formação de AGEs na saliva glicada, dessa forma, torna-se necessário um maior aprofundamento nessa área.

As amostras de saliva foram sujeitas a *Western blotting*, que revelou uma redução significativa na expressão da  $\alpha$ -amilase, dada em % de densidade de pixels, após glicação com MGO. Este resultado corrobora com os demais obtidos anteriormente, em que a saliva glicada com MGO resultou em aumento na intensidade de fluorescência, indicando formação de AGEs provenientes de MGO, e inibiu a atividade enzimática. Em Bhattarai et al. (2018), verificaram que a expressão da  $\alpha$ -amilase em células da glândula salivar humana é diminuída pela hiperglicemia. Muitos trabalhos utilizam o método de *Western blotting* para detecção da  $\alpha$ -amilase salivar (MOGI et al., 1986; DASSO et al., 2011). No entanto, a relação desta enzima na saliva com o processo de glicação e formação de AGEs ainda é pouco explorado.

Várias pesquisas têm buscado detectar na saliva biomarcadores relacionados ao diabetes, sendo os AGEs um potencial candidato (BĂBŢAN et al., 2019; ALTINGÖZ et al., 2020; ALGERBAN, 2020; GARAY-SEVILLA et al., 2005). Ansari et al. (2009) utilizaram a técnica de FTIR para verificar os produtos de Amadori e concluíram que a proteína glicada pode ser um bom biomarcador diagnóstico para o processo de glicação precoce no diabetes. Esses possíveis biomarcadores podem exibir assinaturas específicas no espectro infravermelho na saliva, já que as absorvâncias de vibração dos espectros das cadeias laterais associadas à glicação parecem ser bem proeminentes neste fluido (SCOTT et al., 2010).

Os resultados encontrados neste trabalho pela análise do FTIR indicaram que as principais bandas dos espectros da glicação de BSA, lisozima e saliva pela frutose e MGO foram os modos vibracionais que correspondem a estruturas principalmente relacionadas a proteínas. Na glicação do BSA com frutose, os principais picos que contribuíram para a diferenciação do BSA glicado e BSA puro foram os picos  $1748\text{ cm}^{-1}$ ,  $1679\text{ cm}^{-1}$ ,  $1614\text{ cm}^{-1}$  e  $1230\text{ cm}^{-1}$ . Do ponto de vista químico esses picos são correspondentes à vibração de C=O de proteínas ( $1748\text{ cm}^{-1}$ ), componentes de amida I de proteínas ( $1679\text{ cm}^{-1}$  e  $1614\text{ cm}^{-1}$ ) e sobreposição de amida III de proteínas ( $1230\text{ cm}^{-1}$ ) (COATES, 2000; LAZAREVSKA e MAKRESKI, 2015). Já na glicação do BSA com MGO os principais picos que representaram a sua diferenciação do BSA puro foram  $1745$

$\text{cm}^{-1}$ ,  $1622 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1514 \text{ cm}^{-1}$ , e  $1322 \text{ cm}^{-1}$ , sendo estes picos relacionados a vibração de C=O de proteínas ( $1745 \text{ cm}^{-1}$ ), componentes de amida I de proteínas ( $1622 \text{ cm}^{-1}$ ), componentes de amida II de proteínas ( $1514 \text{ cm}^{-1}$ ) e componentes de amida III de proteínas ( $1322 \text{ cm}^{-1}$ ) (CEBI et al., 2020). O processo de glicação do BSA foi verificado pelo método de FTIR em alguns estudos, que corroboram os resultados encontrados neste trabalho. Em Tupe e Agte (2010) bandas referentes à amida II sofreram alterações pela glicação; Liu, Xing e Jing (2018) observaram alterações em regiões do espectro de amida II e amida III após glicação do BSA; e Das et al. (2020) também revelaram perda de alfa-helicidade na proteína, indicado por alteração na banda de amida II de  $1547 \text{ cm}^{-1}$ . Desta forma, a análise dos picos que refletiram diferenciações por ATR-FTIR neste estudo pode ser utilizada como indicativo do processo de glicação do BSA por frutose e MGO.

Em relação ao processo de glicação da lisozima com frutose e MGO, os principais picos que representam a diferenciação da lisozima glicada tanto com frutose quanto com MGO em relação à lisozima pura foram:  $1756 \text{ cm}^{-1}$  (vibração de C=O de proteínas),  $1621 \text{ cm}^{-1}$  (componentes de amida I de proteínas),  $1518 \text{ cm}^{-1}$  (componentes de amida II de proteínas),  $1329 \text{ cm}^{-1}$  (deformação angular simétrica fora do plano de  $\text{CH}_2$ ) e  $1242 \text{ cm}^{-1}$  (amida III) (TARANTILIS et al., 2012). Estes resultados estão de acordo com os achados de Xing e Yaylayan (2019), em que observaram mudanças significativas no espectro da lisozima glicada em picos de aproximadamente  $1650 \text{ cm}^{-1}$ , o que resultou em perda da  $\alpha$ -hélice, levando a uma perda da conformação ativa e consequentemente diminuição da ação enzimática. O estudo de McAvan et al. (2020) com lisozima glicada, resultou em alterações no espectro de vibração em torno de  $1200 \text{ cm}^{-1}$ , região de amida III. Portanto, a utilização do método de ATR-FTIR em conjunto com a análise de PCA também foi capaz de avaliar e distinguir o processo de glicação na lisozima pela frutose e MGO.

Na análise da saliva glicada pela frutose e MGO, foi observada a diferenciação nos picos representados por saliva pura e saliva glicada com frutose. Os principais picos que representaram essa diferenciação foram  $1671 \text{ cm}^{-1}$  (componentes de amida I de proteínas),  $1655 \text{ cm}^{-1}$  (componentes de amida I de proteínas),  $1378 \text{ cm}^{-1}$  (alongamento C-O e deformação C-H),  $1363 \text{ cm}^{-1}$  (alongamento C-O e deformação C-H) e  $1347 \text{ cm}^{-1}$  (deformação angular



simétrica fora do plano de CH<sub>2</sub>) (FRINGELI, 1977). Este resultado pode ser comparado com estudos que analisaram o perfil de espectro da saliva de indivíduos diabéticos. Bottoni et al. (2016) mostraram diferenças na saliva de diabéticos em relação à saliva controle em picos de aproximadamente 3331 cm<sup>-1</sup> e 1645 cm<sup>-1</sup>, sendo essas bandas referentes a componentes aquosos da saliva (3600 cm<sup>-1</sup> a 3000 cm<sup>-1</sup>) e alongamento C=O da amida I (1717 cm<sup>-1</sup> a 1600 cm<sup>-1</sup>). A análise dessas bandas indicou que os picos de 1630 cm<sup>-1</sup> e 1654 cm<sup>-1</sup> se referem respectivamente a folhas-β e α-hélices (KONG e YU, 2007). Em Scott et al. (2010) utilizaram o método de FTIR com o objetivo de analisar as assinaturas espectrais na saliva de indivíduos diabéticos e saudáveis, e foi observado o componente da α-hélice alterado, com pico em 1640 cm<sup>-1</sup>, na região de amida I. Desse modo, o uso do ATR-FTIR possibilitou verificar as distinções no processo de glicação da saliva com frutose e assim comparar com análises anteriores realizadas em salivas de indivíduos diabéticos. No entanto, não foi evidenciado nesse trabalho a separação clara entre os espectros da saliva pura e saliva glicada com MGO. É provável que possa haver uma relação com os danos oxidativos aumentados que foram encontrados na saliva glicada com MGO.

De maneira geral, os principais achados neste estudo indicam que os açúcares frutose e/ou MGO levaram à formação de AGEs e a danos oxidativos quando incubados com saliva e proteínas BSA, lisozima e α-amilase salivar, com destaque para a glicação da saliva, que mostrou ser um material biológico possível de ser utilizado para a análise de AGEs, tornando-se uma alternativa vantajosa para uso no âmbito do diabetes. Com poucos estudos na literatura envolvendo glicação e saliva, este trabalho apresenta uma relevância no encaminhamento de futuros resultados que possibilitem o avanço na área de diagnóstico clínico do diabetes através da análise de AGEs na saliva.

## 6. CONCLUSÃO

O processo de glicação e formação de produtos finais de glicação avançada na saliva, em particular, pelos derivados do MGO, apresentou resultados significativos em fluorescência, atividade enzimática da α-amilase, danos oxidativos e *Western blotting*; e a glicação da saliva pela frutose apresentou diferenciações para análise em ATR-FTIR. Portanto, a saliva

mostrou ser um fluido capaz de indicar a presença de AGEs após ter sido submetida à glicação por 21 dias. Dessa forma, os resultados sugerem que os AGEs na saliva possuem potencial para contribuir para uma possível melhoria na avaliação e acompanhamento do quadro de pacientes diabéticos de forma acessível e não invasiva. Além disso, em decorrência dos escassos estudos na literatura envolvendo a glicação da saliva e da  $\alpha$ -amilase salivar, este trabalho pode contribuir para o direcionamento de mais pesquisas nessa área.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLSAMADI H, et al. Reduction of Melatonin Level in Patients with Type II Diabetes and Periodontal Diseases. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**. v.8, n.3, p.160-165, 2014.
- ADA. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v.42, (Suppl. 1):S13–S28, 2019. <https://doi.org/10.2337/dc19-S002>
- ADISAKWATTANA, S., et al Cinnamic acid and its derivatives inhibit fructose-mediated protein glycation. **Int J Mol Sci.**, v.13, n.2, p.1778-1789, 2012. <https://doi.org/10.3390/ijms13021778>
- AHMAD S., et al. AGEs, RAGEs and s-RAGE; friend or foe for cancer. **Semin Cancer Biol.** v.49, p.44-55, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.07.001>
- AHMAD, M.S.; PISCHETSRIEDER, M.; AHMED, N. Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation endproducts. **Eur J Pharmacol.**, v.561, n.1-3, p.32-38, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.01.041>
- AHMED N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v.67, n.1, p.3-21, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004>
- AHMED, N., et al. Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. **Biochim Biophys Acta.**, v.1639, n.2, p.121-132, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.08.002>
- ALJOHI, A.; MATOU-NASRI, S.; AHMED, N. Antiglycation and Antioxidant Properties of Momordica charantia. **PLoS One.**, v.11, n.8, e.0159985, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159985>
- ALLAMAN, I.; BÉLANGER, M.; MAGISTRETTI, P.J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Front Neurosci.**, v.9, p.9-23, 2015. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00023>
- ALQERBAN, A. Levels of proinflammatory chemokines and advanced glycation end products in patients with type-2 diabetes mellitus undergoing fixed orthodontic treatment. **Angle Orthod**, v. 91, n.1, p. 105-110, 2020. <https://doi.org/10.2319/051120-420.1>
- ALTINGÖZ, S.M., et al. Salivary and serum oxidative stress biomarkers and advanced glycation end products in periodontitis patients with or without diabetes: A cross-sectional study. **J Periodontol**, 2020. Disponível em: <https://aap.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/JPER.20-0406> Acesso em: 23 jan 2021. <https://doi.org/10.1002/JPER.20-0406>

AMANO, O., et al. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. **Acta Histochem Cytochem**, v.45, n.5, p.241-250, 2012.

<https://doi.org/10.1267/ahc.12013>

ANDERSEN, S.T., et al. Risk Factors for Incident Diabetic Polyneuropathy in a Cohort With Screen-Detected Type 2 Diabetes Followed for 13 Years: ADDITION-Denmark. **Diabetes Care.**, v.41, n.5, p.1068-1075, 2018.

<https://doi.org/10.2337/dc17-2062>

ANGELIS, K.; SCHAAN, B.A.; RODRIGUES, B.; MALFITANO, C.; IRIGOYEN, M.C. Disfunção autonômica cardiovascular no diabetes mellitus experimental. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.51, n.2, p.185-94, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000200007>

ANGUIZOLA, J., et al Review: Glycation of human serum albumin. **Clinica Chimica Acta**, v.425, p.64–76, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.07.013>

ANSARI, N.A., et al. Preferential recognition of Amadori-rich lysine residues by serum antibodies in diabetes mellitus: role of protein glycation in the disease process. **Hum Immunol.**, v.70, n.6, p.417-424,

2009. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.03.015>

ARASTEH A., et al. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. **J Diabetes Metab Disord.** 2014.

<https://doi.org/10.1186/2251-6581-13-49>

ARONSON D. Potential role of advanced glycosylation end products in promoting restenosis in diabetes and renal failure. **Med Hypotheses.** v. 59, n. 3, p.297–301, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(02\)00172-X](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(02)00172-X)

AYDIN, S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. **J Biochem Mol Biol.**, v.40, n.1, p.29-35, 2007.

<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2007.40.1.029>

AZZOPARDI, E., et al. Clinical applications of amylase: Novel perspectives.

**Surgery.**, v.160, n.1, p.26-37, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.01.005>

BĂBȚAN A.M., et al. Advanced glycation end products as biomarkers in systemic diseases: premises and perspectives of salivary advanced glycation end products. **Biomark Med.** v.13, n.6, p.479-495, 2019.

<https://doi.org/10.2217/bmm-2018-0448>

BABU, N.A., et al. Saliva-the key regulator of oral changes in diabetes patients. **IJPSR.** v.5, p.2579–2583, 2014.

BACCHETTI, T., et al. Glycation of human high density lipoprotein by methylglyoxal: effect on HDL-paonoxonase activity. **Metabolism.**, v.63, n.3, p.307-11, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.10.013>

- BALAN, P., et al. Can saliva offer an advantage in monitoring of diabetes mellitus? - A case control study. **J Clin Exp Dent.**, v.6, n.4, p.335-338, 2014. <https://doi.org/10.4317/jced.51386>
- BANERJEE, S. Methylglyoxal modification reduces the sensitivity of hen egg white lysozyme to stress-induced aggregation: Insight into the anti-amyloidogenic property of  $\alpha$ -dicarbonyl compound. **J Biomol Struct Dyn.**, v.38, n.18, p.5474-5487, 2020. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1702589>
- BARBOSA, J.H.P., et al. A determination of advanced glycation (ages) and lipoxidation (ales) end products in foods and biological systems: advances, challenges and perspectives. **Química Nova**, v.39, n.5, 608-620, 2016. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20160048>
- BARBOSA, J.H.P.; OLIVEIRA, S.L.; SEARA, L.T. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.52, n.6, p. 940-950, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000600005>
- BARREIROS, R. C.; BOSSOLAN, G.; TRINDADE, C. E. P. Fructose in humans: metabolic effects, clinical utilization, and associated inherent errors. **Rev. Nutr.**, v.18, suppl.3, p.377-389, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732005000300010>
- BARTOSZ, I. S.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G. Kinetics of glycooxidation of bovine serum albumin by methylglyoxal and glyoxal and its prevention by various compounds. **Molecules**, v.19, n.4, p.4880-4896, abr. 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules19044880>
- BELLIER, J., et al. Methylglyoxal, a potent inducer of AGEs, connects between diabetes and cancer. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.148, p.200-211, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.01.002>
- BENN, A.M.; THOMSON, W.M. Saliva: an overview. **N Z Dent J.**, v.110, n.3, p.92-96, 2014.
- BERG, T.J., et al. Increased serum levels of advanced glycation end products (AGEs) in children and adolescents with IDDM. **Diabetes Care.**, v.20, n.6, p.1006-1008, 1997. <https://doi.org/10.2337/diacare.20.6.1006>
- BERLETT, B.S.; STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J Biol Chem.**, v.272, n.33, p.20313-20316, 1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
- BHATTARAI, K.R., et al. Ixeris dentata Extract Increases Salivary Secretion through the Regulation of Endoplasmic Reticulum Stress in a Diabetes-Induced Xerostomia Rat Model. **Int J Mol Sci.**, v.19, n.4, p.1059, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19041059>

- BIERHAUS A, et al Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **J Mol Med (Berl)**, v.83, n.11, p.876-886, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0688-7>
- BIERHAUS A., et al. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. **Cardiovascular Research**, v.37, n.3, p.586-600, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(97\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(97)00233-2)
- BISWAS, S.; CHIDA, A.S.; RAHMAN, I. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. **Biochem Pharmacol**, v.71, n.5, p.551-564, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.044>
- BLAKE, C.C.F., et al. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. **Nature**, v. 206, p.757–761, 1965. <https://doi.org/10.1038/206757a0>
- BOSCH, J.A. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. **Psychosom Medicine**, v.65, p.245–258,2003. <https://doi.org/10.1097/01.PSY.0000058376.50240.2D>
- BOTTONI, U, et al. Infrared Saliva Analysis of Psoriatic and Diabetic Patients: Similarities in Protein Components. **IEEE Trans Biomed Eng.**, v.63, n.2, p.379-384, 2016. <https://doi.org/10.1109/TBME.2015.2458967>
- BOULANGER, E., DEQUIEDT, P.; WAUTIER, J.L. Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins? **Nephrologie**, v.23, p.351-359, 2002.
- BOUMA, B., et al. Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. **J Biol Chem.**, v.278, n.43, p.41810-41819, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303925200>
- BOURDON, E.; LOREAU, N.; BLACHE, D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. **FASEB J.**, v.13, n.2, p.233-244, 1999. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.2.233>
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** v.1, p.248-54, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, n.6, p.1615-1625,2005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.13, n.414, suppl.6865, p.813-820, 2001. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- BROWNLEE, M. The pathological implications of protein glycation. **Clinical and Investigative Medicine**, v.18, n.275-281, 1995.

BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N Engl J Med.** v.318, n.20, p.1315-21, 1988. <https://doi.org/10.1056/NEJM198805193182007>

CAI W., et al. Advanced glycation end product (AGE) receptor 1 suppresses cell oxidant stress and activation signaling via EGF receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.103, n.37, p.13801-13806, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600362103>

CAI W., et al. AGE-receptor-1 counteracts cellular oxidant stress induced by AGEs via negative regulation of p66shc-dependent FKHRL1 phosphorylation. **Am J Physiol Cell Physiol.**, v.294, n.1, p.145-152, 2008. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00350.2007>

CALDERON, G.D., et al. Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment. **Eye**, v.31, n.8, p.1122-1130, 2017. <https://doi.org/10.1038/eye.2017.64>

CEBI, N., et al. An evaluation of FTIR spectroscopy for prediction of royal jelly content in hive products. **Journal of Apicultural Research**, v.59, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1707009>

CERIELLO, A.; IHNAT, M.A.; THORPE, J.E. Clinical review 2: The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications? **J Clin Endocrinol Metab.**, v.94, n.2, p.410-415, 2009. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1824>

CHATTERJEE, S.; KHUNTI, K.; DAVIES, M. J. Type 2 diabetes. **Lancet**, v.389, p.2239–2251, 2017. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)

CHEUNG, S.T.; FONDA, M.L. Reaction of phenylglyoxal with arginine. The effect of buffers and pH. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.90, n.3, p.940-947, 1979. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)91918-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)91918-1)

CHIU, C.J., et al. Studies of advanced glycation end products and oxidation biomarkers for type 2 diabetes. **Biofactors.**, v.44, n.3, p.281-288, 2018. <https://doi.org/10.1002/biof.1423>

COATES, J. Interpretation of infrared spectra: A practical approach. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, p.10815–10837, 2000.

COLE, J.B.; FLOREZ, J.C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nat Rev Nephrol**, v.16, n.7, p.377-390, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-0278-5>

CORDAIN, L., et al Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v.81, n.2, p.341-354, 2005. <https://doi.org/10.1093/ajcn.81.2.341>

DAS, A., et al. Ribosylation induced structural changes in Bovine Serum Albumin: understanding high dietary sugar induced protein aggregation and



amyloid formation. **Heliyon.**, v.6, n.9, e05053, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05053>

DASSO, M., et al. Effect of bitter compounds on amylase secretion in murine submandibular glands: Signaling pathway mechanisms. **Biochim Biophys Acta.**, v.1810, n.12, v.1212-1219, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.08.009>

DESHPANDE, A. D., HARRIS- HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes- related complications. **Phys. Ther.** V.88, p.1254–1264, 2008. <https://doi.org/10.2522/ptj.20080020>

DIAZ GÓMEZ, M.M. Dinâmica de marcadores salivares de atividade autônoma e adrenocortical em resposta à competição de elite. 68f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, 2011.

DODDS, M.W.; YEH, C.K.; JOHNSON, D.A. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. **Commun Dent Oral Epidemiol**, v.28, p.373–381, 2000. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2000.028005373.x>

DODSON, G.; STEINER, D. The role of assembly in insulin's biosynthesis. **Curr Opin Struct Biol.** v.8, n.2, p.189-94, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(98\)80037-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(98)80037-7)

DOLHOFER-BLIESENER, R.; GERBITZ, K.D. Impairment by glycation of immunoglobulin G Fc fragment function. **Scand J Clin Lab Invest.**, v.50, n.7, p.739-746, 1990. <https://doi.org/10.3109/00365519009091067>

DORNADULA, S., et al. Pathophysiological insights of methylglyoxal induced type-2 diabetes. **Chem Res Toxicol.**, v.28, n.9, p.1666-1674, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00171>

DU, X.L., et al. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proc Natl Acad Sci**, v.97, n.22, p.12222-12226, 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.12222>

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics.** v.82 p.70–77,1959. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

ELOSTA, A., et al. Aged garlic has more potent antiglycation and antioxidant properties compared to fresh garlic extract *in vitro*. **Scientific Reports.** 7, 39613, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep39613>

EREN, M.A., et al. The evaluation of thiol/disulphide homeostasis in diabetic nephropathy. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.148, p.249-253, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.01.022>



ERGIN, M., et al. The Variation of Disulfides in the Progression of Type 2 Diabetes Mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.128, n.2, p.77-81, 2020. <https://doi.org/10.1055/s-0044-100376>

EVANS, T.W. Albumin as a drug-biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure, **Aliment Pharmacol Ther**, suppl.1, v.5, p.6-11, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.16.s5.2.x>

FAIST, V.; ERBERSDOBLER, H.F. Metabolic transit and *in vivo* effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard reaction. **Ann Nutr Metab**, v.45, p.1–12, 2001. <https://doi.org/10.1159/000046699>

FAJANS, S.S.; BELL, G.I.; POLONSKY, K.S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. **N Engl J Med**, v.345, p.971-980, 2001. <https://doi.org/10.1056/NEJMra002168>

FEENER, E. P.; KING, G. L. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. **Lancet**, suppl.350, p.9-13, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)90022-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)90022-2)

FERNANDES, J.; SUDUBRAY, J-M; VAN, D. B. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and treatment. (3<sup>rd</sup> ed): Springer, **Heidelberg Germany**; p.117–26, 2000.

FISHMAN, S.L., et al. The role of advanced glycation end-products in the development of coronary artery disease in patients with and without diabetes mellitus: a review. **Mol Med.**, v.24, n.1, p.59, 2018. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0060-3>

FOSS-FREITAS, M.C.; FOSS, M.C. Cetoacidose Diabética e Estado Hiperglicêmico Hiperosmolar. **Revista Medicina (Ribeirão Preto)**, v.36, n.2/4c.5, 2003. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v36i2/4p389-393>

FOURNET, M.; BONTÉ, F.; DESMOULIÈRE, A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. **Aging Dis**, v.9, n.5, p.880-900. Published 2018 Oct 1. doi:10.14336/AD.2017.1121, 2018. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.1121>

FRANCO, R.R., et al Antidiabetic potential of Bauhinia forficata Link leaves: a non-cytotoxic source of lipase and glycoside hydrolases inhibitors and molecules with antioxidant and antiglycation properties. **Biomed Pharmacother**. v.123, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109798>

FRANCO, R.R., et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol.**, v.215, p.140-146, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

FRINGELI, U.P. The structure of lipids and proteins studied by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy. II. Oriented layers of a homologous series: phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. **Z Naturforsch C Biosci.**, v.32, n. 1-2, p.20-45, 1977. <https://doi.org/10.1515/znc-1977-1-205>

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of Insulin Synthesis and Secretion and Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes. **Curr Diabetes Rev.**, v.9, n.1, p.25-53, 2013. <https://doi.org/10.2174/157339913804143225>

GAGLIARDI, P.A., et al. 3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 Controls Breast Tumor Growth in a Kinase-Dependent but Akt-Independent Manner. **Neoplasia**, v.14, n.8, p.719-731, 2012. <https://doi.org/10.1593/neo.12856>

GARAY-SEVILLA, M.E., et al. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus. **J Endocrinol Invest.**, v.28, n.3, p.223-230, 2005. <https://doi.org/10.1007/BF03345377>

GHOSH, S., et al. Prolonged glycation of hen egg white lysozyme generates non amyloidal structures. **PLoS One.**, v.8, n.9, e.74336, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074336>

GIBBINS, H.L., et al. What interactions drive the salivary mucosal pellicle formation? **Colloids Surf B Biointerfaces.**, v.120, n.100, p.184-92, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.020>

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n.4, p.1143-52, 2008. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-1817>

GOLDBERG, T., et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods. **J Am Diet Assoc**, v.104, n.8, p.1287-1291,2004. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.05.214>

GOLDIN, A. Advanced glycation end products. Sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v.114, n.6, p.597-605, 2006. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621854>

GONZÁLEZ, R.G., et al. 31P NMR studies of the diabetic lens. **Magn Reson Med.**, v.6, n.4, p.435-444, 1988. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910060409>

GRANGER, D. A. et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. **Physiol Behav**, v. 92, n. 4, p. 583-90, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.05.004>

GUGLIUCCI, A. Formation of Fructose-Mediated Advanced Glycation End Products and Their Roles in Metabolic and Inflammatory Diseases. **Adv Nutr.**, v.8, n.1, p.54-62, 2017. <https://doi.org/10.3945/an.116.013912>

GULPAMUK, B., et al. The significance of thiol/disulfide homeostasis and ischemia-modified albumin levels to assess the oxidative stress in patients with different stages of diabetes mellitus. **Scand J Clin Lab Invest.** v.78, n.1-2, p.136-142, 2018. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1422540>

- HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **FASEB J.**, v.4, n.9, p.2652-2660, 1990. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.9.2189777>
- HASSANEEN, M., MARON, J.L. Salivary Diagnostics in Pediatrics: Applicability, Translatability, and Limitations. **Front Public Health**, v.5, p.83, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00083>
- HATTORI Y, et al. Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts). **Hypertension**. v.39, n.1, p.22-8, 2002. <https://doi.org/10.1161/hy1201.097300>
- HAVLIKOVA M., et al. Electrocatalytic assay for monitoring methylglyoxal-mediated protein glycation. **Anal Chem**. v.87, n.3, p.1757-63, 2015. <https://doi.org/10.1021/ac503705d>
- HE, C.J., et al. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-receptor-1 and elevated serum AGE. **Mol Med.**, v.7, n.3, p.159-168, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF03401949>
- HENLE, T. Protein-bound advanced glycation endproducts (AGEs) as bioactive amino acid derivatives in foods. **Amino Acids**, v.29, n.4, p.313-22, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0200-2>
- HENLE, T. Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. **Z Lebensm Unters Forsch**, v.199, p.55–58, 1994. <https://doi.org/10.1007/BF01192954>
- HERMAN, W.; KALYANI, R.; CHERRINGTON, A. American diabetes association standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v.40 (Suppl. 1), S1–S132, 2017. <https://doi.org/10.2337/dci17-0007>
- HINTON, D.J.; AMES, J.M. Site specificity of glycation and carboxymethylation of bovine serum albumin by fructose. **Amino Acids.**, v.30, n.4, p.425-434, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0269-2>
- HOFMANN, M. A., et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**. v.97, 889–901, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80801-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80801-6)
- HU, S.; LOO, J.A.; WONG, D.T. Human saliva proteome analysis and disease biomarker discovery. **Expert Rev Proteomics.**, v.4, n.4, p.531-538, 2007. <https://doi.org/10.1586/14789450.4.4.531>
- HU, S., et al. Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. **Proteomics.**, v.5, n.6, p.1714-1728, 2005. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401037>

HUMPHREY, S.P.; WILLIAMSON, R.T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **J Prosthet Dent.**, v.85, n.2, p.162-169, 2001.

<https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>

IBRAHIM, H.R.; AOKI T.; PILLEGRINI, A. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: Lysozyme and aprotinin as model molecules. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n.9, p.671-693, 2002.

<https://doi.org/10.2174/1381612023395349>

IDF. International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas**. 9ed., 2019.

Disponível em <<http://www.diabetesatlas.org>> Acesso em 02/12/2020.

INDIRA, M., et al. Evaluation of salivary glucose, amylase, and total protein in Type 2 diabetes mellitus patients. **Indian J Dent Res**, v.26, n.3, p.271-275,

2015. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.162883>

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Research**, v.53, n.2, p.131-42, 2004.

JOUBERT, M., et al. Chewing bread: impact on alpha-amylase secretion and oral digestion. **Food & Function**, 8, 607– 614, 2017.

<https://doi.org/10.1039/C6FO00963H>

JUSTINO, A.B., et al. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. **Sci Rep.**, v.9, n.1, 1918p., 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

JUSTINO, A.B., et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorg Chem.**, v.69, p.167-182, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>

KAHN, S.E.; MCCULLOCH, D.K.; PORTE, D. Insulin secretion in the normal and diabetic human. In: Alberti KGMM, Zimmet P, Defronzo RA, Keen H, **International Textbook of Diabetes Mellitus**. (2nd ed) John Wiley & Sons, New York, p.337-54, 1997.

KALLITHRAKA, S., BAKKER, J., E CLIFFORD, M. N. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. **Journal of Sensory Studies**, 13, 29–44,

1998. <https://doi.org/10.1111/j.1745-459X.1998.tb00073.x>

KAMO T., et al. Levels of Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products in Bronchoalveolar Lavage Fluid in Patients with Various Inflammatory Lung Diseases. **Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med**, v.28, n.9, supl.1,

p.147-154, 2016. <https://doi.org/10.4137/CCRPM.S23326>

KARLÍK, M., et al. Markers of oxidative stress in plasma and saliva in patients with multiple sclerosis. **Clin Biochem.**, v.48, n.1-2, p.24-8, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.023>

KAUFFMAN , D.L.; ZAGER, N.I.; COHEN, E.; KELLER, P.J.; The isoenzymes of human parotid amylase. **Arch Biochem Biophys**. v.37, n.2, p.325-39, 1970. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(70\)90446-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(70)90446-7)

KAUFMAN, E.; LAMSTER, I.B. The diagnostic applications of saliva – A review. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.13, p.197–212, 2002. <https://doi.org/10.1177/154411130201300209>

KAUL K, et al. Introduction to diabetes mellitus. **Adv Exp Med Biol**, v.771, p.1-11, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_1)

KHURSHID, Z., et al. Advances of Proteomic Sciences in Dentistry. **Int J Mol Sci.**, v.17, n.5, p.728, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17050728>

KOLM-LITTY, V., et al. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. **J. Clin. Invest**, v.101, p.160–169, 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI119875>

KONG, J.; YU, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochim Biophys Sin.**, v.39, n.8, p.549-559, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>

KOSCHINSKY, T., et al. Orally absorbed reactive glycation products (glicotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci**, v.94, n.12, p.6476-6479, 1997. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6474>

KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes** v.47, p.859–866, 1998. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.6.859>

LADGOTRA, A.; VERMA, P.; RAJ, S.S. Estimation of Salivary and Serum Biomarkers in Diabetic and Non Diabetic Patients - A Comparative Study. **J Clin Diagn Res**. v.10, n.6, p.56-61, 2016. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/19135.7995>

LANE AR, HACKNEY AC. Relationship between salivary and serum testosterone levels in response to different exercise intensities. **Hormones (Athens)**. v.14, n.2, p.258-264, 2015. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1561>

LAROQUE, D., et al. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. **Food Chem**, v.111, p.1032–1042, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.033>

LAWRENCE, H.P. Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. **J Can Dent Assoc.**, v.68, n.3, p.170-174, 2002.

LAZAREVSKA, S.; MAKRESKI, P. Insights into the infrared and Raman spectra of fresh and lyophilized Royal Jelly and protein degradation IR spectroscopy study during heating. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v.34, n.1, p.87–88, 2015. <https://doi.org/10.20450/mjcce.2015.669>

LI, Y.M. Glycation ligand binding motif in lactoferrin. Implications in diabetic infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.443, p.57-63, 1998. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9068-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9068-9_7)

LIGGINS, J.; FURTH, A.J. Role of protein-bound carbonyl groups in the formation of advanced glycation endproducts. **Biochim Biophys Acta.**, v.1361, n.2, p.123-130, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(97\)00023-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(97)00023-9)

LIM, J.S., et al. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v.7, p.251–264, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.41>

LIMA-ARAGÃO, M.V., et al. Salivary profile in diabetic patients: biochemical and immunological evaluation. **BMC Res Notes.**, v.9, p.103, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1881-1>

LIN, L. Rage on the toll road? **Cell Mol Immunol**, v.3, n.5, p.351-358, 2006.

LIU J, et al. Eriodictyol and naringenin inhibit the formation of AGEs: An in vitro and molecular interaction study. **J Mol Recognit.** v.33, n.1, e2814, 2020. <https://doi.org/10.1002/jmr.2814>

LIU, J.; XING, X.; JING, H. Differentiation of glycated residue numbers on heat-induced structural changes of bovine serum albumin. **J Sci Food Agric.**, v.98, n.6, p.2168-2175, 2018. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8701>

LONGO, M.A., COMBES D. A novel chemoenzymatic glycosylation strategy: application to lysozyme modification. **Febs Lett**, v.37, n.1-2, p.63-66. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)01174-D](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01174-D)

LÓPEZ DEL VALLE, L.M.; OCASIO-LÓPEZ, C. Comparing the oral health status of diabetic and non-diabetic children from Puerto Rico: A case-control pilot study. **P R Health Sci J.**, v.30, p.123–127, 2011.

LORENZI, M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. **Exp Diabetes Res**, 2007:61038, 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/61038>

LUKIC, I.K., et al. The RAGE pathway: activation and perpetuation in the pathogenesis of diabetic neuropathy. **Ann N Y Acad Sci**, suppl.1126, p.76-80, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1433.059>

MAESSEN, D.E.; STEHOUWER, C.D.; SCHALKWIJK, C.G. The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases. **Clin Sci.**, v.128, n.12, p.839-861, 2015. <https://doi.org/10.1042/CS20140683>



MAKINEN, K. Salivary enzymes. In: Tenovuo JO, editor. Human saliva: clinical chemistry and microbiology. **Boca Raton: CRC Press**, p.93–119,1989.

MALAMUD, D. Saliva as a diagnostic fluid – Second now to blood? **BMJ**, v.305, p.207, 1992. <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6847.207>

MALATHI, L., et al. Estimation of salivary amylase in diabetic patients and saliva as a diagnostic tool in early diabetic patients. **J Clin Diagn Res**, v.7, n.11, p.2634-2636, 2013. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/7574.3634>

MANDEL, I.D.; WOTMAN, S. The salivary secretions in health and disease. **Oral Sciences Review**, v. 8, p. 25–47, 1976.

MANIG, F., et al. Quantitation of free glycation compounds in saliva. **PLoS One.**, v.14, n.9, e.0220208, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220208>

MARTINEZ-GONZALEZ A.I., et al. Inhibition of  $\alpha$ -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR). **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** v.206, p.437-447, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.08.057>

MARTÍNEZ, L.M., PAGÁN, D.M., JORNET, P.L.. Trace Elements in Saliva as Markers of Type 2 Diabetes Mellitus. **Biol Trace Elem Res.** v.186, n.2, p.354-360, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1326-x>

MASTROCOLA, R., et al. Advanced glycation endproducts promote hepato steatosis by interfering with SCAP-SREBP pathway in fructose-drinking mice. **Am.J.Physiol. Gastrointest.LiverPhysiol**, v.305 n.6, p.398–407, 2013. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00450.2012>

MATA, A.D., et al. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. **Mol Cell Biochem**, v.261, p.137–142, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000028748.40917.6f>

MATTHAEI, S., et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. **Endocr Rev.**;21(6):585-618, 2000. <https://doi.org/10.1210/er.21.6.585>

MCAVAN, B.S., et al. Quantification of protein glycation using vibrational spectroscopy. **Analyst.**, v.145, n.10, p.3686-3696, 2020. <https://doi.org/10.1039/C9AN02318F>

METZGER, B.E; COUSTAN, D.R. Proceedings of the Fourth International Workshop- Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.21, B1–B167, 1998.

MIR, A.R., et al. Methylglyoxal mediated conformational changes in histone H2A-generation of carboxyethylated advanced glycation end products. **Int J Biol Macromol.**, v.69, p.260-266, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.057>

- MIYATA, T., et al. Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. **J Am Soc Nephrol.**, v.11, n.9, p.1744-1752, 2000.
- MOGI, M., et al. Two-dimensional electrophoresis in the analysis of a mixture of human sublingual and submandibular salivary proteins. **Arch Oral Biol.**, v.31, n.2, p.119-125, 1986. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(86\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0003-9969(86)90035-X)
- MOHD-RADZMAN, N.H., et al. Potential Roles of Stevia rebaudiana Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A **Review. Evid Based Complement Alternat Med.** 2013:718049, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/718049>
- MONNIER, V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Arch Biochem Biophys**, v.419, n.1, p.1-15, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.014>
- MONNIER, V.M.; SELL, D.R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1043, p.567-581, 2005. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.065>
- MORRISH, N. J. et al. Mortality and causes of death in the WHO multinational study of vascular disease in diabetes. **Diabetologia**, v.44 (Suppl. 2), p.14–21, 2001. <https://doi.org/10.1007/PL00002934>
- MOSSINE, V.V., et al. Superoxide free radical generation by Amadori compounds: the role of acyclic forms and metal ions. **Chem Res Toxicol.**, v.12, n.3, p.230-236, 1999. <https://doi.org/10.1021/tx980209e>
- NAKAMOTO I., et al. Correlation between saliva glycated and blood glycated proteins. **Environ Health Prev Med.**, v.8, n.3, p.95-99, 2003. <https://doi.org/10.1265/ehpm.8.95>
- NASERI, R., et al. Effect of diabetes mellitus type 2 on salivary glucose, immunoglobulin A, total protein, and amylase levels in adults: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. **J Res Med Sci.**, v.23, p.89, 2018. [https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS\\_135\\_18](https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_135_18)
- NAVAZESH, M. Methods for collecting saliva. **Annals of the New York Academy of Science**, Saliva as a diagnostic fluid. p.216-233, 1993.
- NEUMANN, A. High molecular weight hyaluronic acid acid inhibits advanced glycation endproduct induced NF-kB activation and cytokine expression. **FEBS Lett**, v.453, p. 283–287, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00731-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00731-0)
- NICOLAU, J. Buffering capacity and amylase activity in the saliva in the diagnosis of dental caries in children. **Rev Bras Odontol.**, v.25, n.142, p.413-417, 1966.



NOWOTNY, K. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. **Biomolecules**, v.5, n.1, p.194-222, 2015.

<https://doi.org/10.3390/biom5010194>

ODETTI, P., et al. Levels of carbonyl groups in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus subjects. **Acta Diabetol.**, v.36, n.4, p.179-183, 1999.

<https://doi.org/10.1007/s005920050164>

OIMOMI, M., et al. Fructose-related glycation. **Diabetes Res Clin Pract.**, v.7, n.2, p.137-179, 1989. [https://doi.org/10.1016/0168-8227\(89\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0168-8227(89)90104-6)

OLIVEIRA, V.N. Avaliação de diferentes tipos de treinamento físico sobre o estresse oxidativo e parâmetros bioquímicos em diabetes mellitus tipo II e o efeito do exercício agudo sobre os biomarcadores salivares em atletas. 104f. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, 2010.

OU J, et al. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation in vitro. **Food Chem.** v.15, n.221, p.1057-1061, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.056>

PANCHBHAI, A.S.; DEGWEKAR, S.S., BHOWTE RR. Estimation of salivary glucose, salivary amylase, salivary total protein and salivary flow rate in diabetics in India. **J Oral Sci**, v.52, n.3, p.359-368, 2010.

<https://doi.org/10.2334/josnurd.52.359>

PAPADAKI, M., et al. Diabetes with heart failure increases methylglyoxal modifications in the sarcomere, which inhibit function. **JCI Insight**. v.3, n.20, ex.121264, 2018. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121264>

PATTI, M.E.; KAHN, C.R. The insulin receptor  $\beta$  a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **J Basic Clin Physiol Pharmacol** 1998, v.9, p.89-109. <https://doi.org/10.1515/JBCPP.1998.9.2-4.89>

PEACOCK T.P., et al. Comparison of glycated albumin and hemoglobin A(1c) levels in diabetic subjects on hemodialysis. **Kidney Int.** v.73, n.9, p.1062-8, 2008. <https://doi.org/10.1038/ki.2008.25>

PEPYS, M.B., et al. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis. **Nature**, v.362, p.553–557, 1993.

<https://doi.org/10.1038/362553a0>

PERERA, H.K.; HANDUWALAGE, C.S. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. **BMC Complement Altern Med.**, v.15, p.175, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0689-1>

PERERA, H.K.; PREMADASA, W.K.; POONGUNRAN, J.  $\alpha$ -glucosidase and glycation inhibitory effects of costus speciosus leaves. **BMC Complement Altern Med.**, v.16, n.2, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0982-z>

PERRONE, A., et al. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects. **Oxid Med Cell Longev.**, 2020:3818196, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3818196>

POWROZNIK, B., et al. Enhancement of lysozyme stability and activity by polyamines. **Biochimie**, v.86, v.9-10, p.651-656, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.09.009>

PRASAD, K.; MISHRA, M. AGE-RAGE Stress, Stressors, and Antistressors in Health and Disease. **Int J Angiol.**, v.27, n.1, p.1-12, 2018. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613678>

RAI, A.K., et al. Flavonoids from *Polyalthia longifolia* prevents advanced glycation end products formation and protein oxidation aligned with fructose-induced protein glycation. **Nat Prod Res.**, v.4, p.1-5, 2019. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1672690>

RAI, A.K., et al. Fructose-induced AGEs-RAGE signaling in skeletal muscle contributes to impairment of glucose homeostasis. **J Nutr Biochem.**, v.71, p.35-44, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.05.016>

RAMALINGAM, L.; OH, E.; THURMOND, D.C. Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates. **Cell Mol Life Sci.**, v.70, n.16, p.2815-2834, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1176-1>

RAMASAMY, R.; SHEKHTMAN, A.; SCHMIDT, A.M. The multiple faces of RAGE--opportunities for therapeutic intervention in aging and chronic disease. **Expert Opin Ther Targets**, v.20, n.4, p.431-446,2016. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1111873>

RAO, N.L., et al. Salivary C-Reactive Protein in Hashimoto's Thyroiditis and Subacute Thyroiditis. **Int J Inflamm**, suppl.514659, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/514659>

RAO, P.V., et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. **J Proteome Res.**, v.8, n.1, p.239-245, 2009. <https://doi.org/10.1021/pr8003776>

ROBERTS, M.J. DNA damage by carbonyl stress in human skin cells. **Mutat Res.**, v.28, n.522, p.45-56, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00232-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00232-4)

RONDEAU, P.; BOURDON, E. The glycation of albumin: Structural and functional impacts. **Biochimie**, v.93, p.645-658, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.003>

RUDERMAN, N.B.; WILLIAMSON, J.R.; BROWNLEE, M. Glucose and diabetic vascular disease. **FASEB J.**, v.6, n.11, p.2905-2914, 1992. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.11.1644256>

RUGGIERO-LOPEZ D, et al. Growth modulation of retinal microvascular cells by early and advanced glycation products. **Diabetes Res Clin Pract.** v.34, n.3, p.135-42,1997.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G. Kinetics of glycooxidation of bovine serum albumin by methylglyoxal and glyoxal and its prevention by various compounds. **Molecules.**, v.19, n.4, p.4880-4896, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules19044880>

SAITO, A., et al. Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products. **J Am Soc Nephrol.**, v.14, n.5, p.1123-1131, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000062962.51879.F8>

SAKAI, M.; OIMOMI, M.; KASUGA, M. Experimental studies on the role of fructose in the development of diabetic complications. **Kobe J Med Sci.**, v.48, n.5-6, p.125-136, 2002.

SAKIHARA, S., et al Evaluation of plasma, salivary, and urinary cortisol levels for diagnosis of Cushing's syndrome. **Endocr J.**, v.57, n.4, p.331-337, 2010. <https://doi.org/10.1507/endocrj.K09E-340>

SBEM. Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia. Diabetes Mellitus Gestacional. **Rev Assoc Med Bras**, v.54, n.6, p.471- 486, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000600006>

SCHAAN, B. D. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.47, suppl.6, p.654-662, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000600006>

SCHMIDT, A.M. SOLUBLE RAGEs - Prospects for treating & tracking metabolic and inflammatory disease. **Vascul Pharmacol**, v.72, p.1-8, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.06.011>

SCHMITT, A., et al. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and fluorescence characteristics. **Anal Biochem.**, v.338, n.2, p.201-215, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.003>

SCOTT, D.A. Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. **Diabetol Metab Syndr.**, v.2, p.48, 2010. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-48>

SHEKHTMAN, A.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A.M. Glycation & the RAGE axis: targeting signal transduction through DIAPH1. **Expert Rev Proteomics**, v.14, n.2, p.147-156, 2017. <https://doi.org/10.1080/14789450.2017.1271719>

SHIMOIKE, T., et al. The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy. **Metabolism.**, v.49, n.8, p.1030-1035, 2000. <https://doi.org/10.1053/meta.2000.7738>

SHINOHARA, M., et al. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproduct formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. **J Clin Invest.**, v.101, n.5, p.1142-1147, 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI119885>

SIMÓ-SERVAT, O., et al. Assessment of advanced glycation end-products as a biomarker of diabetic outcomes. **Endocrinol Diabetes Nutr.**, v.65, n.9, p.540-545, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2018.06.003>

SINGH, R., et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia.**, v.44, n.2, p.129-146, 2001. <https://doi.org/10.1007/s001250051591>

SINGH, V.P., et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. **Korean J Physiol Pharmacol.** v.18, n.1, p.1-14, 2014. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2014.18.1.1>

SKYLER, J.S., et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v.66,n.2, p.241-55, 2017. <https://doi.org/10.2337/db16-0806>

SMRITI, K, et al. Salivary Glucose as a Diagnostic Marker for Diabetes Mellitus. **J Diabetes Sci Technol.** v.10, p.991–992, 2016. <https://doi.org/10.1177/1932296816637619>

STERN, D.M., et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. **Ageing Res Rev.** v.1, n.1, p.1-15, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00366-9](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00366-9)

SU, H., et al. Altered redox homeostasis in human diabetes saliva. **J Oral Pathol Med.**, v.41, n.3, p.235-41, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01092.x>

SZAPACS, M.E.; RIGGINS, J.N.; ZIMMERMAN, L.J.; LIEBLER, D.C. Covalent adduction of human serum albumin by 4-hydroxy-2-nonenal: kinetic analysis of competing alkylation reactions. **Biochemistry**, v.45, p.10521-10528, 2006. <https://doi.org/10.1021/bi060535q>

SZWERGOLD, B.S.; KAPPLER, F.; BROWN, T.R. Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. **Science.**, v.26, n.247, suppl.4941, 451-454, 1990. <https://doi.org/10.1126/science.2300805>

TAGAMI, U., et al. Structural studies of the Maillard reaction products of a protein using ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v.35, p.131-138, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200002\)35:2<131::AID-JMS920>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200002)35:2<131::AID-JMS920>3.0.CO;2-0)

TAGHAVI, F., et al. The status of glycation in protein aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.100, p.67-74, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.085>

- TAHARA, N., et al. Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are independent correlates of insulin resistance in nondiabetic subjects. **Cardiovasc Ther.**, v.30, n.1, p.42-48, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00177.x>
- TAKADA T, et al. Serum monomeric  $\alpha$ 2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes. **Atherosclerosis.**, v. 228, n.1, p.270-6, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.035>
- TAKAGI Y, et al. Significance of fructose-induced protein oxidation and formation of advanced glycation end product. **J Diabetes Complications.**, v.9, n.2, p.87-91, 1995. [https://doi.org/10.1016/1056-8727\(94\)00022-G](https://doi.org/10.1016/1056-8727(94)00022-G)
- TAM, X. H. et al. Enhanced expression of receptor for advanced glycation end-products is associated with low circulating soluble isoforms of the receptor in Type 2 diabetes. **Clin Sci**, v. 120, p. 81-9, 2011. <https://doi.org/10.1042/CS20100256>
- TARANTILIS, P.A., et al. Monitoring of royal jelly protein degradation during storage using Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Journal of Apicultural Research**, v.51, p.185-192, 2012. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.2.07>
- TARWADI KV, AGTE VV. Effect of micronutrients on methylglyoxal-mediated in vitro glycation of albumin. **Biol Trace Elem Res.** v.143, n.2, p.717-25, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8915-7>
- TEFF, K.L., et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose and glucose-Sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. **J Clin Endocrinol Metab**, v.94, n.5, p.1562-1569, 2009. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2192>
- TELCI A, et al. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. **Horm Metab Res.**, v.32, n.1, p.40-43, 2000. <https://doi.org/10.1055/s-2007-978584>
- TESSIER, F.J.; BIRLOUEZ-ARAGON, I. Health effects of dietary Maillard reaction products: the results of ICARE and other studies. **Amino Acids**, v.42, p.1119–1131, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0776-z>
- THORNALLEY, P.J. Dicarbonyl intermediates in the maillard reaction. **Ann N Y Acad Sci.**, v.1043, p.111-117, 2005. <https://doi.org/10.1196/annals.1333.014>
- THORNALLEY, P.J., et al. Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. **Biochem J.**, v.1, n.375, p.581-592, 2003. <https://doi.org/10.1042/bj20030763>
- THORNALLEY, P.J.; LANGBORG, A.; MINHAS, H.S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. **Biochem J.**, v.344, Pt 1, p.109-116, 1999. <https://doi.org/10.1042/bj3440109>

- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Biotechnology**, v.24, p. 145-9, 1992.
- TUPE, R., AGTE, V. Interaction of zinc, ascorbic acid, and folic acid in glycation with albumin as protein model. **Biol Trace Elem Res.**, v.138, n.1-3, p.346-357, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12011-010-8610-8>
- URIBARRI, J., TUTTLE, K.R. Advanced glycation end products and nephrotoxicity of high-protein diets. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.1, n.6, p.1293-1299, 2006. <https://doi.org/10.2215/CJN.01270406>
- VANDER JAGT, D.L., et al. Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. **Chem Biol Interact.**, v.1, n.3, p.549-62, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00298-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00298-2)
- VISTOLI, G., et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radic Res.** suppl.47, v.1, p.3-27, 2013. <https://doi.org/10.3109/10715762.2013.815348>
- VITORINO, R., et al. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. **Proteomics.**, v.4, n.4, p.1109-15, 2004. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300638>
- WALDMANN, T.A. Albumin Structure, Function and Uses. **Pergamon Press**, 255 ed., 273 p., 1977. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-019603-9.50018-1>
- WANG, Y.M.; VAN EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Ann Rev Nutr**, v.1, p.437-475, 1981. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.01.070181.002253>
- WANG, S.H., et al. Modified fast procedure for the detection and screening of antiglycative phytochemicals. **J Agric Food Chem.**, v.59, n.13, p.6906-6912, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf201103t>
- WANG, X.J., et al. Measurement of  $\alpha$ -dicarbonyl compounds in human saliva by pre-column derivatization HPLC. **Clin Chem Lab Med.**, v.57, n.12, p.1915-1922, 2019. <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0350>
- WATANABE, M., et al. Diurnal glycemic fluctuation is associated with severity of coronary artery disease in prediabetic patients: Possible role of nitrotyrosine and glyceraldehyde-derived advanced glycation end products. **J Cardiol.**, v.69, n.4, p.625-631, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2016.07.001>
- WAUTIER, J.L.; GUILLAUSSEAU, P.J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diabetes Metab.**, v.27, n.5, p.535-542, 2001.



WAUTIER, M.P., et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.280, n.5, p.685-694, 2001. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.5.E685>

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 13, n. 10, p. 444-451, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(02\)00662-8](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00662-8)

WONG, D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. **The Journal of the American Dental Association**, v.137, p.313–321, 2006. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0180>

WOOD, M. Plasma drug binding: implications for anesthesiologists. **Anesthesia & Analgesia**, v.65, p.786-804, 1986. <https://doi.org/10.1213/00000539-198607000-00015>

WU, J. W., et al. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. **Food Chem.**, v.113, p.78–84, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.025>

XIAO, H.; LIU, M. Atypical protein kinase C in cell motility. **Cell Mol Life Sci.**, v.70, n.17, p.3057-3066, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1192-1>

XING. H.; YAYLAYAN, V. Mechanochemically Induced Controlled Glycation of Lysozyme and Its Effect on Enzymatic Activity and Conformational Changes. **J Agric Food Chem.**, v.67, n.11, p.3249-3255, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00070>

YANG, Z., et al. Age differences of salivary alpha-amylase levels of basal and acute responses to citric acid stimulation between Chinese children and adults. **Front Physiology**, v.6, n.340, 2015. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00340>

YAVUZYILMAZ, E., et al. The alterations of whole saliva constituents in patients with diabetes mellitus. **Aust Dent J.**, v.41, n.3, p.193-197, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1996.tb04855.x>

YOON, M.S., et al. Characterisation of advanced glycation endproducts in saliva from patients with diabetes mellitus. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.323, n.2, p.377-381, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.118>

ZAKOWSKI, J.J.; BRUNS, D.E. Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v.21, p.283–322, 1985. <https://doi.org/10.3109/10408368509165786>

ZENG J., et al. Evidence for inactivation of cysteine proteases by reactive carbonyls via glycation of active site thiols. **Biochem J.**, v.398, n.2, p.197-206, 2006. <https://doi.org/10.1042/BJ20060019>

ZHANG, A., et al. Salivary proteomics in biomedical research. **Clinica Chimica Acta – Journal**, v.16, n.415, p.261–265, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.11.001>

ZHANG, L., et al. Insights into the Mechanism of Quercetin against BSA-Fructose Glycation by Spectroscopy and High-Resolution Mass Spectrometry: Effect on Physicochemical Properties. **J Agric Food Chem.**, v.67, n.1, p.236-246, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06075>

ZHANG, Q., et al. O. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. **Journal of Proteome Research**, v.8, n.754, 2008.

<https://doi.org/10.1021/pr800858h>

ZHANG, Q.J., et al. Using resonance light scattering and UV/vis absorption spectroscopy to study the interaction between gliclazide and bovine serum albumin. **Luminescence.**, v.31, n.5, p.1109-1114, 2016.

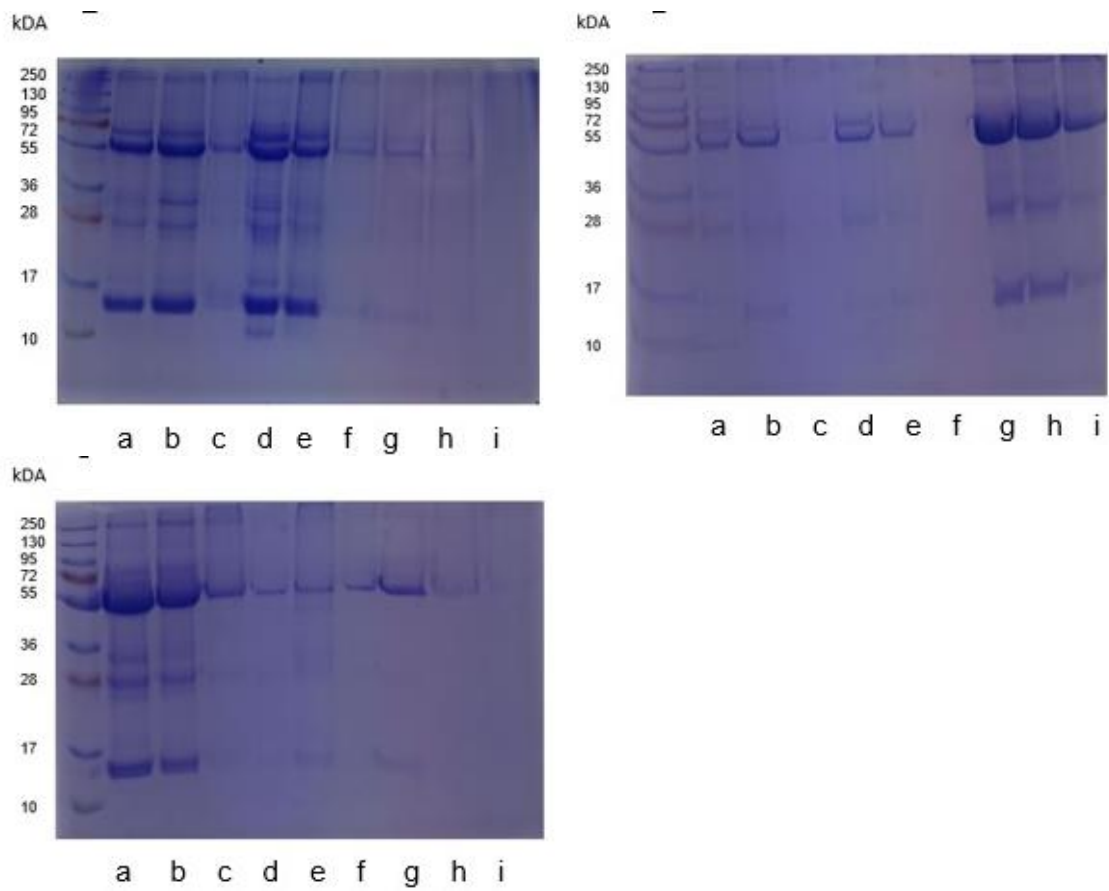
<https://doi.org/10.1002/bio.3079>

ZOLOTUKHIN S. Metabolic hormones in saliva: Origins and functions. **Oral Diseases**, v.19, p.219–229, 2013. <https://doi.org/10.1111/odi.12015>

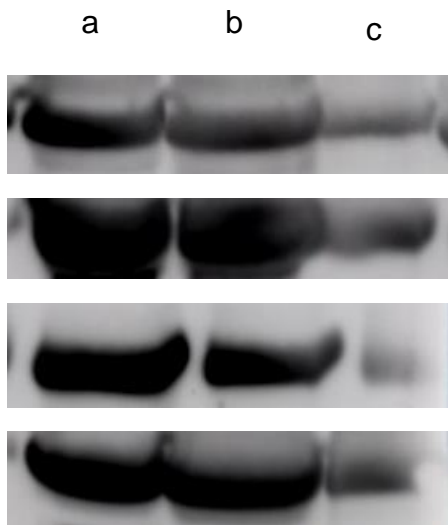
ŻURAWSKA-PŁAKSEJ E., et al. The effect of glycation on bovine serum albumin conformation and ligand binding properties with regard to gliclazide. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.**, v.15, n.189, p.625-633, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.08.071>



## ANEXOS



Perfis proteicos (SDS-PAGE) a partir da glicação das amostras de saliva. Faixas a, d e g: saliva pura; faixas b, e e h: saliva+frutose; faixas c, f e i: saliva+MGO.



Western Blot da  $\alpha$ -amilase salivar após glicação das amostras de saliva. Banda a: saliva pura; b: saliva+frutose; c: saliva+MGO.