



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

Análise da glândula parótida de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina relacionada a alterações de biomarcadores antioxidantes e deposição de colágeno tipo I

Aluna: Simone Ramos Deconte

Orientador: Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Dr. Alberto da Silva Moraes

UBERLÂNDIA - MG

2010



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

Análise da glândula parótida de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina relacionada a alterações de biomarcadores antioxidantes e deposição de colágeno tipo I

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

Aluna: Simone Ramos Deconte

Orientador: Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Dr. Alberto da Silva Moraes

UBERLÂNDIA - MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D296a Deconte, Simone Ramos, 1984-

Análise da glândula parótida de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina relacionada a alterações de biomarcadores antioxidantes e deposição de colágeno tipo I [manuscrito] / Simone Ramos Deconte. - 2010.

61 f. : il.

Orientador: Foued Salmen Espindola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Diabetes - Teses. 2. Glândulas parótidas - Teses. I. Espindola, Foued Salmen. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.. III. Título.

CDU: 616.379-008.64

Palavras-chave: Diabetes, glândula parótida, estresse oxidativo, acarbose, colágeno tipo I, estreptozotocina.



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

Análise da glândula parótida de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina relacionada a alterações de biomarcadores antioxidantes e deposição de colágeno tipo I

Aluna: Simone Ramos Deconte

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Foued Samen Espindola

Examinadores:

Dr. Adriano Mota Loyola

Dra. Sayuri Myamoto

Dra. Françoise Vasconcelos Botelho

Dra. Nádia Carla Cheik

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA-MG

DEDICATÓRIA

Aos meus dois anjos e pais, Rubens e Neuza, exemplos a serem seguidos. Obrigada pelo incentivo, amor, carinho, conversas e compreensão. Se não fosse por vocês, nunca teria chegado até aqui. Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Deus, que com Sua sabedoria, me guiou por caminhos tão bons.

À minha irmã Mônica, que sempre me cuidou e confortou, ajudando a enfrentar os problemas com palavras de força e amizade.

Ao meu namorado Márcio, que esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelo apoio, amor, ajuda e por compreender todos os momentos em que estive ausente.

Aos meus padrinhos, Agnes e Raul, que foram fundamentais para o começo de minha caminhada. Obrigada por tudo, mesmo que longe, a presença e o amor de vocês estão marcados em meu coração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pelo apoio, convivência, incentivo, aprendizado científico e por acreditar em mim. Obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador, Prof. Alberto da Silva Moraes, pelo apoio e por se mostrar sempre disponível a ajudar.

Ao Prof. Adriano Loyola, que gentilmente nos cedeu seu laboratório possibilitando a realização de parte das análises.

Ao Prof. Mundim e Felipe, pela isponibilidade de laboratório e ajuda nas análises oxidativas.

À Neire, Fabiana e Fernanda, que iniciaram esta linha de pesquisa e que com muita coragem e entusiasmo levaram a frente este estudo, possibilitando novos estudos que acabaram por fazer minha Defesa.

Às minhas amigas e amigos de laboratório, Alice, Artur, Ismair, Izabela, Leo Bruno, Marielle, Miguel, Olga Renata e Tati. Obrigada pelas dicas, convivência e amizade.

À minha amiga, companheira, anjinho e co-orientadora do coração Luciana (Lu), que me ajudou a tornar possível esta jornada, sempre determinada e fazendo tudo com muito amor, lutando sempre, sofrendo junto e não desistindo nunca. Amo muito você.

Ao meu amigo e irmão de todas as horas Renato, que tornou mais fácil este trabalho, estando sempre ao meu lado lutando e se divertindo nas manhãs, tardes, noites e madrugadas que passamos juntos durante esse dois anos.

À minha amigona Vanessinha que com seu jeito “discreto” conquistou meu coração e me ensinou a seguir sempre em frente, sem medo dos obstáculos que estiverem por vir.

Ao meu querido amigo Decivaldo (Vicentin) que se mostrou sempre disposto a ajudar e sempre me socorreu nas longas madrugadas de trabalho.

À minha amiga Débora (Bah) que me apoiou na realização deste trabalho.

À minha amiga Tati “louca”, por fazer parte desta história e me ajudar em momentos importantes. Obrigada pela amizade.

Ao nosso querido Gerson, que se dedica ao trabalho e nos ajuda com os problemas, além de ser um ombro amigo.

À CAPES, que nos deu todo o apoio e suporte para realização deste estudo.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica por tornar possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	2
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
1. DIABETES.....	3
1.1 Hiperglicemia e insulina	4
1.2 Inibidores da hiperglicemia	6
Figura 1.....	7
1.3 Estresse oxidativo.....	8
1.3.1 Complicações teciduais.....	11
2. PARÓTIDA E DIABETES.....	14
3. REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO II	29
ANALYSIS IN THE PAROTID GLAND OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS RELATED TO ALTERATIONS OF ANTIOXIDANT BIOMARKERS AND COLLAGEN TYPE I DEPOSITION.....	29
Abstract.....	32
Introduction	33
Material and Methods.....	35
Animals	35
Diabetes induction.....	35
Sample collection	36
Homogenate preparation.....	36
Oxidative stress markers analysis	36
TAS, SOD and GPx activity.....	36
Histology and measurement of collagen	37
Statistical analysis.....	37
Results	37
Discussion	39
Acknowledgements.....	43

FIGURE LEGENDS..... 44

FIGURES 45

Figure 1 45

Figure 2 46

TABLE 47

Table 1..... 47

References 48

LISTA DE ABREVIATURAS

AGEs - Produtos finais de glicação avançada
CAT- Catalase
DM - Diabetes Mellitus
DM1 - DM tipo 1
DM2 - DM tipo 2
EROs - Espécies reativas do oxigênio
GAD - Antidescarboxilase do ácido glutâmico
GLUT - Transportador de glicose
GR - Glutathione redutase
GSH - Glutathione reduzida
GPx - Glutathione peroxidase
GSSG - Glutathione oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IAA - Antiinsulina
IA2- Antitirosina-fosfatase
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB - Fator de transcrição nuclear kappa B
PKC – Proteína quinase C
RAGEs – Receptores de produtos finais de glicação avançada
SOD - Superóxido dismutase
STZ – Streptozotocina
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

APRESENTAÇÃO

Os resultados referentes a esta dissertação estão apresentados em dois capítulos sob a forma de referencial teórico (Capítulo I) e Manuscrito (Capítulo II).

O Capítulo I traz um referencial teórico a respeito do diabetes mellitus. Esta é uma doença crônica grave que acomete milhares de pessoas em todo o mundo, necessitando de tratamento intensivo e orientação médica adequada, apresentando alto custo no cuidado à saúde. O estresse oxidativo tem sido relatado como um evento comum na patogênese das complicações do diabetes. Além disso, o aumento nos níveis de produtos da glicoxidação em colágeno pode ser atribuído ao aumento da glicação e ao estresse oxidativo. Várias investigações ainda estão sendo realizadas para desenvolver novos fármacos antidiabéticos que possam amenizar as complicações resultantes do diabetes. Para auxiliar no tratamento do diabetes, medicamentos hipoglicemiantes orais são utilizados, frequentemente uma classe de inibidores de alfa-glicosidase, como a acarbose.

O capítulo II traz o manuscrito que avaliou o efeito do tratamento com a acarbose a partir da análise da glândula parótida de ratos diabéticos induzidos por streptozotocina e as alterações nos biomarcadores antioxidantes são correlacionadas com a deposição do colágeno tipo I.

CAPÍTULO I

Fundamentação Teórica

1. Diabetes

Devido ao aumento da expectativa de vida, crescimento populacional, diminuição de práticas de atividades físicas e por consequência a incidência de obesidade, o número de indivíduos diagnosticados com diabetes mellitus (DM) tem aumentado (Njolstad et al., 2010). Segundo estimativas recentes, a população humana em todo o mundo está no meio de uma epidemia de DM e, apesar dos grandes avanços que têm sido realizados para a compreensão e gestão desta doença, complicações relacionadas estão aumentando ininterruptamente. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, esta doença afeta 246 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que a cada ano, mais de 7 milhões de pessoas desenvolvem a doença e 3.8 milhões de mortes são registradas a cada ano. Nos países em desenvolvimento, a maioria das pessoas com DM está na faixa de 45-64 anos de idade. Em contrapartida, a maioria das pessoas com DM nos países desenvolvidos está acima de 64 anos de idade. As projeções para a prevalência do DM para o ano de 2030 apontam aproximadamente 366 milhões de indivíduos em todo o mundo e 11.3 milhões só no Brasil (Wild et al., 2004). Esse quadro provavelmente subestima o impacto real do problema porque mais de 50% da população com DM talvez ainda não tenha sido diagnosticada e, por conseguinte sem tratamento (Gonzalez-Clemente et al., 2003). Acredita-se que mesmo se a prevalência de obesidade continuar estável até 2030, o que parece improvável, prevê-se que o número de pessoas com DM irá dobrar como consequência do envelhecimento da população e da urbanização (Wild et al., 2004). Há uma estimativa de 143 milhões de pessoas no mundo sofrendo de DM do tipo 1, quase cinco vezes mais que as estimativas de dez anos atrás (Tiwari & Rao, 2000).

A classificação atual do DM, proposta pela OMS e pela Associação Americana de Diabetes inclui quatro classes clínicas, sendo as mais prevalentes (Njolstad et al., 2010). O diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) que representa 5-10% dos casos e é o resultado da destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de secreção de insulina. Na

maioria dos casos, essa destruição é mediada por efetores auto-imunes ou auto-anticorpos, como a antiinsulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e antitirosina-fosfatase (IA2) (Palmer et al., 1983). Clinicamente, o diagnóstico de DM 1 é definido pela OMS como hiperglicemia sintomática e/ou cetoacidose diabética à apresentação da doença, com necessidade de tratamento com insulina imediatamente após o diagnóstico (Baynes & Thorpe, 1999). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que é a forma presente em 90-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção de insulina, também caracterizada como uma resistência à insulina. A maioria desses pacientes apresenta sobrepeso ou obesidade e cetoacidose diabética raramente ocorre, podendo ser justificada pelo aumento da secreção de insulina pelas células beta em pacientes que apresentam DM 2 na tentativa de atingir a normoglicemia. Assim, os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar desta modalidade de tratamento para a obtenção de um controle metabólico adequado. Diferentemente do DM 1, não há indicadores específicos para o DM 2 (Njolstad et al., 2010). Quando a insulina está em extrema falta na corrente sanguínea, como no caso DM1, a glicose não consegue 'entrar' nas células e fornecer energia. Assim, o organismo utiliza mecanismos alternativos de produzir glicose e outros compostos energéticos. Os hormônios cortisol, adrenalina e glucagon atuam e promovem a formação de mais glicose pelo fígado através da utilização do tecido adiposo. Nesse processo de quebra da gordura são produzidos corpos cetônicos, juntamente com os ácidos B- hidroxibutírico e o acetoacético, acidificando o sangue e trazendo enorme risco a vida (Ribeiro , 2008). Assim, além de hiperglicemia, o indivíduo diabético frequentemente apresenta um aumento de ácidos graxos livres na corrente sanguínea, gerando um quadro de glicotoxicidade e lipotoxicidade (Njolstad et al., 2010).

1.1 Hiperglicemia e insulina

O DM é uma doença crônica grave caracterizada pela hiperglicemia e pela insuficiência na secreção ou ação da insulina endógena (Sandler et al., 2000; Maritim et al., 2003; Takaike et al., 2010), necessitando de tratamento intensivo e orientação médica adequada (Maia & Araújo, 2004; Levy et al., 2010).

A insulina é um hormônio anabolizante sintetizado pelas células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas que atua no armazenamento de substâncias energéticas e possui papel importante no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Esta se liga aos receptores existentes na membrana plasmática das células alvo desencadeando uma complexa cascata de fosforilações responsáveis pela ação final da insulina no metabolismo anabólico (Caso & McNurlan, 2010), aumentando a permeabilidade celular através da estimulação da síntese de transportadores de glicose (GLUTs) e a sua translocação para a membrana plasmática. Além disso, a insulina estimula a via glicolítica e a síntese dos glicogênios hepático e muscular pela ativação da glicogênio sintase e inibição da glicogênio fosforilase. Além disso, a insulina promove o armazenamento de ácidos graxos e glicerol no tecido adiposo na forma de triacilglicerol e impede a degradação de gorduras pela inibição da lipase sensível a hormônios. No metabolismo de proteínas, a insulina estimula a tradução no RNA-mensageiro, inibe a degradação de proteínas e deprime a taxa de gliconeogênese (Njolstad et al., 2010).

A insuficiência de insulina resulta em hiperglicemia e anormalidades no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Como consequência marcante da insuficiência insulínica tem-se um aumento significativo da glicose circulante no sangue, considerada hiperglicemia. A glicose é a principal fonte de energia do organismo, essencial para o corpo realizar as suas funções, como o crescimento, o reparo, a atividade física e a manutenção da temperatura corporal. Porém, quando em excesso, pode trazer várias complicações à saúde (Helkala et al., 1995).

A hiperglicemia é uma consequência da falta de insulina. Esta apresenta baixa relação com o glucagon, a produção de glicose hepática pela gliconeogênese e/ou glicogenólise, não mais inibidas, e a eficiência da

utilização periférica de glicose pela glicólise torna-se reduzida. A hiperglicemia ocorre durante a busca de um novo equilíbrio entre esses dois processos e esse comportamento é desencadeado pelo fígado devido ao aumento das concentrações de glucagon, que tem sua secreção estimulada pelos neurônios dependentes de insulina. Van de Laar et al. (2005) descreve que a acarbose tem um efeito no controle glicêmico (hemoglobina glicada - 0,8%, glicemia de jejum -1,1 mmol / L, da pós-carga de glicose no sangue - 2,3 mmol / L). Além disso, uma maior taxa de gliconeogênese é facilitada pela proteólise ilimitada, contribuindo para a perda de peso em indivíduos diabéticos devido à proteólise e redução de tecido adiposo presente em ratos diabéticos, pois células com transportadores de glicose insulino-dependentes não captam a glicose necessária para a energia, já que não há insulina suficiente para recrutar GLUT-4. Assim, faz-se necessária a busca por outros substratos tais como ácidos graxos, derivados da degradação de triglicerídeos e aminoácidos derivados da proteólise. A proteólise e a lipólise, que tiveram suas enzimas-chave inativadas pela insulina, são ativadas na presença de glucagon. Além disso, a proteólise é estimulada na presença de cortisol, desencadeada pela ativação do neurônio-insulino-dependente, e a lipólise também é estimulada pela noradrenalina liberada pelo sistema nervoso simpático, que é ativado por neurônios insulino-dependentes, que detectam os níveis de insulina (Lehninger, 2002).

1.2 Inibidores da hiperglicemia

Uma abordagem terapêutica para o tratamento do DM é diminuir a hiperglicemia pós-prandial. Isso é feito para retardar a absorção de glicose por meio da inibição de enzimas carboidrato-hidrolizantes, alfa-amilase e alfa-glucosidase no aparelho digestivo (Ali et al., 2006). Os medicamentos de uso oral utilizados no tratamento do DM são substâncias derivadas das sulfoniluréias, das biguanidas, dos inibidores das alfa-glicosidases (acarbose) (Figura 1), das glitazonas (thi-azolidinedionas) e, recentemente,

das chamadas metiglinidas, substâncias do ácido benzóico ou da fenilalanina (Costa & Almeida, 2004).

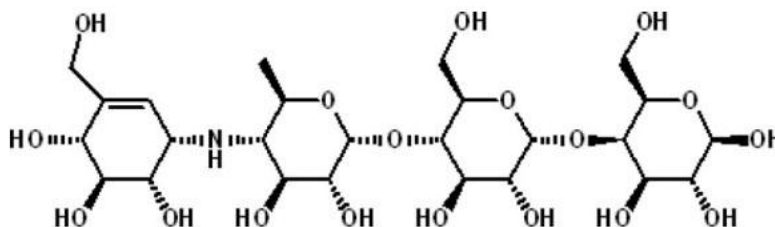


Figura 1 – Estrutura química da acarbose (Hwangseo et al., 2000)

O DM apresenta alto custo nos cuidados à saúde (Mednieks et al., 2009). Devido a alta prevalência desta condição, modelos animais de DM têm sido desenvolvidos e aprimorados ao longo dos anos, sendo os roedores os que melhor descrevem esta condição. Assim, as injeções de aloxano e streptozotocina (STZ) descrevem as características morfológicas da destruição das células beta pancreáticas, com consequente morte celular por necrose (Lenzen, 2007) caracterizando o quadro diabético. Algumas investigações têm descrito os efeitos experimentais do DM induzido por STZ (Changrani et al., 2006; Simoes et al., 2009; Algandaby et al., 2010) relatando que a glicose no sangue encontra-se em níveis elevados 10 dias após a injeção (Bourey et al., 1990; Changrani et al. 2006).

Uma extensa investigação ainda está sendo realizada para desenvolver novos fármacos antidiabéticos e determinar seus mecanismos de ação (Tesch & Allen, 2007). No estudo do DM, medicamentos hipoglicemiantes orais são utilizados no tratamento de pacientes com DM (Knowler et al., 2002; Chiasson et al., 2004; Lee et al., 2008; Shinde et al., 2008) como a acarbose (Figura 1) um inibidor da alfa-glicosidase (Nathan et al., 2007). Os inibidores da alfa-glicosidase atrasam a absorção de carboidratos no intestino delgado e, portanto, têm um efeito de redução na glicemia pós prandial e nos níveis de insulina (Van de Laar et al., 2005). Por outro lado, a hiperglicemia persistente, no estado diabético pode provocar alta produção de radicais livres em muitos tecidos (Kakkar et al., 1995) gerado no processo de auto-oxidação direta da glicose e glicosilação de proteínas (Bonnetfont-Rousselot et al., 2000).

1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo e o dano aumentado em biomoléculas têm sido proposto como um possível unificador dos mecanismos para o desenvolvimento de complicações no DM. Este dano é correlacionado em tecidos afetados com um desarranjo sistêmico do metabolismo do DM (Dyer et al., 1993).

O aumento na glicose circulante condiciona o indivíduo diabético a um quadro de hiperglicemia crônica desencadeando alterações no metabolismo de carboidratos (Acheson, 2010), lipídeos e proteínas (Alberti et al., 1998), resultando em distúrbios no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor da formação de danos, denominado estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2003) sendo seu aumento amplamente aceito como participante no desenvolvimento e progressão do DM e suas complicações (Baynes & Thorpe, 1999; Ceriello, 2000).

O DM é geralmente acompanhado por um aumento da produção de radicais livres ou um comprometimento das defesas antioxidantes (Saxena et al., 1993). Os mecanismos de aumento do estresse oxidativo estão relacionados com as complicações diabéticas e são parcialmente conhecidos, incluindo ativação de fatores de transcrição, produtos finais de glicação avançada (AGEs) e proteína quinase C (PKC). Uma das teorias é que o aumento da concentração de glicose no organismo causaria a glicosilação de macromoléculas, que levaria a uma modificação não-enzimática, diminuindo a função biológica. Nesse processo são gerados radicais livres que agem por todo o organismo promovendo o dano oxidativo (Rellier et al., 1999).

Crescentes evidências indicam que o aumento na produção e/ou sequestro inefetivo das espécies reativas do oxigênio (EROs) são cruciais na determinação dos danos teciduais. Assim, vários trabalhos têm focado no estado antioxidante e no estresse oxidativo na condição diabética (Uzel et al., 1987; Jennings, 1994; Oranje et al., 1999). Entretanto, ainda não há um

consenso se o estresse oxidativo é um fator primário das complicações diabéticas, ou se este é meramente consequência dos danos teciduais, refletindo a presença dessas complicações. Trabalhos que avaliaram o controle do DM e suas complicações indicam a hiperglicemia como o fator de risco para as complicações da doença (Baynes & Thorpe, 1999) devido 1) ao aumento do fluxo pela via dos polióis, gerando estresse oxidativo (Lopes et al., 2008) ou aumentando a glicação de proteínas plasmáticas e da matriz extra-celular (Wautier et al., 1994) 2) a ativação da via da PKC, gerando aumento de citocinas, estresse oxidativo e fatores proliferativos (Ishii et al., 1998) 3) ao aumento do fluxo pela via das hexosaminas (Sharma & Ziyadeh, 1997). Segundo Bayners & Thorpe (1999) cada hipótese para a geração do estresse oxidativo é um reflexo diferente de um mesmo mecanismo patogênico.

A formação das EROs e sua neutralização estão associadas à defesa antioxidante em pessoas saudáveis, principalmente devido aos mecanismos de defesa celular. Grande quantidade de estudos têm se concentrado sobre o papel do estresse oxidativo, e foi relatado que esta condição pode constituir o principal acontecimento comum na patogênese de complicações diabéticas secundárias (Ceriello, 2000). O aumento do nível de EROs no DM pode ser devido ao aumento da produção e/ou diminuição da destruição por mecanismos antioxidantes, que influenciam a suscetibilidade de diferentes tecidos ao estresse oxidativo e está associada com o desenvolvimento de complicações no DM. O estresse oxidativo maior tem sido observada em pacientes diabéticos, pelo aumento da produção de radicais livres (Valko et al., 2007), peroxidação lipídica e capacidade antioxidante diminuída (Ugochukwu & Cobourne, 2003; Nogueira et al., 2005).

A hiperglicemia engendrada por radicais livres também prejudica o sistema de defesa antioxidante endógeno durante o DM (Saxena et al., 1993). Os mecanismos de defesa antioxidante envolvem estratégias antioxidantes tanto enzimáticas como não enzimáticas sendo mais comuns as vitaminas A, C e E, glutathione, e enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase. Outros antioxidantes incluem o ácido lipóico, carotenóides mistos, coenzima Q10, vários

bioflavonóides, minerais antioxidantes (cobre, zinco, manganês e selênio), e os cofatores (ácido fólico, vitaminas B1, B2, B6, B12) que trabalham em sinergia entre si e contra os diferentes tipos de radicais livres. Amplos estudos de intervenções farmacológicas com base em antioxidantes biológicos têm sido realizados. Discrepâncias nos biomarcadores do estresse oxidativo em animais diabéticos têm sido observadas em relação às atividades da SOD, GPx e CAT. A diminuição dos níveis de glutathione e concentrações elevadas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) são constantemente observados no DM. Além disso, alterações no óxido nítrico e proteínas glicosiladas também são relatados.

A SOD é uma enzima considerada primária, uma vez que está envolvida na eliminação direta das EROs (Halliwell & Gutteridge, 1997), sendo de defesa antioxidante importante pois catalisa a dismutação de radicais superóxido (Bonnefont-Rousselot et al., 2000). Outra importante enzima é a GPx, considerada como uma enzima biologicamente essencial na redução do peróxido de hidrogênio, desintoxicando peróxidos com GSH agindo como um doador de elétrons na reação de redução, produzindo glutathione oxidada (GSSG) como um produto final (Townsend et al., 2003). O aumento na atividade da SOD em animais diabéticos, possivelmente faz-se devido ao aumento da dismutação do ânion superóxido de oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio como uma resposta adaptativa ao aumento do estresse oxidativo (Blum & Fridovich, 1985). No sistema enzimático antioxidante salivar, peroxidase é de longe a enzima mais importante (Matsunaga et al., 1994). Além da SOD e da GPx, a CAT, uma enzima heme-proteína, atua como um antioxidante enzimático, catalisando a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Semelhante a outros sistemas biológicos, o sistema antioxidante salivar inclui várias moléculas e enzimas das quais as mais importantes são o ácido úrico e a enzima peroxidase, sendo solúveis em água (Moore et al., 1994; Hirayama et al., 1997; Meucci et al., 1998). A atividade da peroxidase em animais diabéticos foi relatada ser maior comparada com o controle em alguns tecidos, como o rim (Kakkar et al., 1997; Gumieniczek et al., 2001), o músculo (Gumieniczek et al., 2001), o coração e o cérebro (Fridovich, 1995),

e inferior no fígado (Genet et al., 2002; Panneerselvam & Govindasamy, 2004).

Por outro lado, a glicose tem um papel importante no acúmulo de colágeno nos tecidos, aumentando a síntese de colágeno no nível da transcrição. O processo de glicação de colágeno inibe a sua degradação por interferência na ação de enzimas, tais como metaloproteinases (Mizushige et al., 2000). O estado hiperglicêmico leva à formação de AGEs nos componentes da matriz e acelera o crosslinking de colágeno. Sua deposição nos tecidos contribui para a rigidez em indivíduos diabéticos. O estado hiperglicêmico é o principal responsável pelo processo de AGEs (Algandaby et al., 2010) e tem um papel fundamental no desenvolvimento de complicações causadas por DM (Foster & Samman, 2010). A formação de AGEs modifica as proteínas que formam as ligações entre os grupos amino e outras proteínas, alterando a estrutura da matriz extracelular. Kohda et al. (2009) demonstrou que a hiperglicemia acelera a síntese de colágeno tipo I e III, por um processo que envolve proteínas quinases (MAPKs) promovendo fibrose no tecido intersticial do miocárdio.

1.3.1 Complicações teciduais

O desequilíbrio provocado pelo DM causa entre os agentes oxidantes e antioxidantes uma série de eventos danosos às funções celulares normais, provocando, por exemplo, alterações séricas de lipídeos, insulina e glicose nos tecidos musculares, que ocasionam modificações dos fatores de transcrição celular dos miócitos cardíacos, disfunção endotelial e aumento da rigidez miocárdica, afetando a função normal do coração (Poornima et al., 2006). Outro exemplo é a glândula salivar, que apresenta uma série de alterações na sua composição histológica, como o acúmulo de tecido adiposo, ocorrendo mudanças na sensibilidade de receptores do sistema nervoso autônomo, além de possíveis microangiopatias manifestadas pela alteração em sua vasodilatação, um desequilíbrio do sistema antioxidante e

alteração no metabolismo de glicose e glicogênio (Ferreira, 2006). As alterações macrovasculares estão frequentemente associadas ao DM e afetam artérias que suprem o coração, cérebro e extremidade corporal. As micro e macroangiopatias diabéticas estão correlacionadas com a hiperglicemia e são responsáveis pela impotência sexual, arteriosclerose, retinopatias, neuropatia e nefropatia (Brownlee & Cerami, 1981).

O aumento da produção de EROs pelas mitocôndrias em condições hiperglicêmicas é reconhecido como uma das principais causas de complicações clínicas associadas ao DM e à obesidade, resultando em um aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos diabéticos (Morales et al., 2010). Os níveis excessivamente elevados de radicais livres causam danos nas proteínas celulares, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos e, eventualmente, a morte celular.

Acredita-se que a oxidação de glicose seja a principal fonte de radicais livres. Na sua forma enediol, a glicose é oxidada em uma reação de transição metal-dependente para um ânion radical enediol que, por sua vez, são convertidos em reativos cetoaldeídos radicais de ânions superóxido. O ânion superóxido pode sofrer dismutação sendo convertido em peróxido de hidrogênio que, se não degradado pela CAT ou GPx, pode levar a produção de radicais hidroxila, extremamente reativos na presença de metais de transição (Jiang et al., 1990). Os radicais ânion superóxido podem também reagir com o óxido nítrico para formar uma espécie não radicalar (Halliwell & Gutteridge, 2003).

Além disso, é visto que a hiperglicemia promove a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) por uma via superóxido-dependente resultando na geração de radicais livres (Tsai et al., 1994). Outra importante fonte de radicais livres no DM é a interação da glicose com proteínas, levando à formação de um produto de Amadori e AGEs (Yamagishi & Matsui, 2010). Estas AGEs, através de seus receptores (RAGEs), inativam enzimas e alteraram suas estruturas e funções (McCarthy et al., 2001), promovendo a formação de radicais livres, extinguindo e bloqueando os efeitos antiproliferativos do óxido nítrico. Ao aumentar o estresse oxidativo intracelular, as AGEs ativam o fator de transcrição NF- κ B, promovendo

assim a regulação de vários genes. O NF- κ B aumenta a produção de óxido nítrico, que é um mediador de dano celular de ilhotas de células beta. Evidências mostram que a hiperglicemia estimula a conversão da glicose em sorbitol e frutose com o consumo de NADPH e glutathione. A diminuição de redutores antioxidantes causa uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo associado ao aumento das EROS intracelular (Foster & Samman, 2010). Além disso, o estresse oxidativo está relacionado com as alterações nos níveis de glutathione reduzida (GSH) e com o esgotamento dos níveis de NADPH. A GSH pode estar aumentada, como já relatado para glândula submandibular ou diminuída, como relatado em glândula parótida de ratos diabéticos (Nogueira et al., 2005). Alternativamente, o aumento da atividade do sorbitol desidrogenase está associado com as alterações nos níveis de NAD⁺ o que resulta em modificações de proteínas por glicosilação não-enzimática de proteína (Williamson et al., 1993).

Os hidroperóxidos têm efeitos tóxicos sobre as células tanto diretamente quanto através da degradação em radical peroxila e/ou alcóxila altamente tóxicos, além de reagirem com metais de transição, como o ferro ou o cobre a fim de formar aldeídos estáveis como os malondialdeídos que danificam membranas celulares. Os radicais peroxila podem promover a abstração de átomo de hidrogênio a partir de lipídeos, produzindo hidroperóxidos e um radical na cadeia do lipídeo, induzindo o processo de propagação da oxidação de lipídeos (Williamson et al., 1993). A indução do DM em ratos com STZ ou aloxano resulta em um aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como uma evidência indireta da intensificação da peroxidação lipídica. O impedimento da formação de radical peroxila e/ou alcóxila seria um meio eficiente para reduzir o dano oxidativo.

Por outro lado, a glicose tem um papel importante no acúmulo de colágeno nos tecidos (Nicolau et al., 2006). O estado hiperglicêmico leva a AGEs na formação dos componentes da matriz e acelera o *crosslinking* de colágeno e sua deposição contribuindo para a rigidez dos tecidos em indivíduos diabéticos, alterando a estrutura da matriz extracelular (Kohda et al., 2009). Nicolau et al. (2006) demonstrou que a hiperglicemia acelera a síntese dos colágenos tipo I e tipo III, e ainda sugere que o aumento da hiperglicemia

altera a deposição de proteínas da matriz extracelular em glândulas parótidas de ratos, indicando que o estado diabético influencia o metabolismo do glicogênio na glândula parótida de ratos.

2. Parótida e Diabetes

As glândulas salivares maiores são constituídas por parótida, submandibular e sublingual, sendo responsáveis por aproximadamente 95% da secreção salivar. Sua disposição básica se compõe por unidades secretoras e um sistema de ductos, sustentados por um tecido conjuntivo. As unidades secretoras, também chamadas de ácinos, são compostas por células mucosas, serosas e mioepiteliais, que variam no tamanho, forma e número. As células serosas são especializadas na síntese, armazenamento e secreção de proteínas, enquanto que a secreção das células mucosas possui um conteúdo menos enzimático e com maior teor de glicoproteínas (Gorr et al., 2005).

As glândulas parótida, submandibular e sublinguais são os principais produtores de fluido oral, conhecido como saliva. As alterações bioquímicas na composição e hipofunção da glândula salivar têm sido associadas às altas concentrações de glicose no jejum. Em diabéticos induzidos por STZ e aloxano ocorrem hipossalivação, que leva a um acúmulo de gotículas lipídicas citoplasmáticas no terminal das peças finais secretoras e nas células do ducto intercalado das três glândulas salivares maiores, e tem sido correlacionado com a alta concentração de glicose no sangue (Anderson, 1987; Kamata et al., 2007).

A amilase é a enzima mais abundante na saliva e é secretada principalmente pelas glândulas parótidas. Ela está envolvida com três funções distintas, dá início ao processo de digestão de carboidratos pela hidrólise do amido, possui afinidade por hidroxiapatita, o que lhe confere participação na formação da película adquirida do esmalte e na colonização

bacteriana (Vacca et al., 2000), além de possuir sítios específicos de ligação com bactérias, *Streptococcus viridans*, por exemplo.

A peroxidase é uma enzima presente na saliva, secretada principalmente pela glândula submandibular e distribuída por todo o organismo. Está envolvida em diversas funções biológicas, variando de acordo com o seu tipo e localidade. Na presença de peróxido de hidrogênio, proveniente do metabolismo bacteriano ou de células como leucócitos, a peroxidase salivar catalisa a transformação de tiocianato, derivado da dieta e do tabaco, em hipotiocianato, que por sua vez inibe o crescimento bacteriano. O espectro antimicrobiano do sistema peroxidase abrange bactérias de origem não oral gram-positivo e gram-negativo, sendo um potencial antiviral e antifúngico (Ihalin et al., 2006). Além disso, a peroxidase catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio, diminuindo a toxicidade celular. Outros tipos, como a mieloperoxidase, podem estar presentes em processos inflamatórios e na placa bacteriana (Tenovuo & Pruitt, 1984).

Alguns autores estudaram a relação do DM com as alterações no equilíbrio bucal e suas manifestações patológicas. Além das implicações gerais, também ocorrem manifestações bucais associadas ao DM como xerostomia, perda de dentes, gengivite, periodontite, abscessos dentais e lesões na mucosa e língua (Darnell & Saundres, 1990).

A xerostomia é um dos principais sintomas relatados por pacientes diabéticos. Este é um parâmetro, diagnosticado através de queixas de boca seca, dificuldades de falar, mastigar, deglutir, entre outros. A hipossalivação é uma medida objetiva que corresponde com a diminuição absoluta do fluxo salivar (Dawes, 2004). Em trabalho realizado no Centro de Pesquisa em Biologia Oral indivíduos com DM2 descompensados apresentaram xerostomia, causada por uma redução absoluta do fluxo salivar, mostrando uma anormalidade na produção de saliva e na sua taxa de secreção (Lin et al., 2002).

Considerando que as funções de síntese e secreção de saliva nas glândulas salivares são mediadas pela estimulação do sistema nervoso autônomo, alguns estudos avaliaram a influência do DM na produção de neurotransmissores, bem como na sensibilidade dos receptores simpáticos e

parassimpáticos. Assim, ratos com DM2 apresentaram uma diminuição na síntese e secreção de noradrenalina em parótida e submandibular, como também o fluxo salivar em resposta a estimulação de receptores adrenérgicos também sofreu uma redução comparada com o controle, o que sugere um comprometimento da transmissão simpática em glândulas salivares (Vatta et al., 2002). Há outros relatos que mostram que a redução do fluxo salivar pode estar associada a uma diminuição da sensibilidade de receptores muscarínicos em decorrência do DM (Watanabe et al., 2001).

Além da alteração em receptores do sistema nervoso autônomo, o DM afeta a via de sinalização desencadeada pela estimulação desses receptores. Há relatos do aumento na expressão de PKC em glândulas salivares de camundongo diabéticos não obesos num curto período de tempo (Tensing et al., 2005). A longo prazo, o estímulo da expressão de PKC poderia levar a um *feed-back* negativo, com comprometimento da síntese protéica em glândulas salivares. Um estudo da vascularização em glândula submandibular de ratos diabéticos induzidos por streptozotocina mostrou uma diminuição da vasodilatação e nenhuma alteração de vasoconstrição estimulada por impulsos simpáticos (Anderson & Garret, 2004) indicando uma possível neuropatia e microangiopatia manifestada em decorrência do DM.

Aspectos estruturais da regulação hormonal das glândulas salivares foram abordados com enfoque no DM experimental (Garret et al., 1998). As principais alterações histológicas apresentadas pelas glândulas salivares de diabéticos são: diminuição no número de grânulos de secreção salivar, acúmulo de gotículas de gordura nas células acinares de parótida e submandibular e uma alteração na proporção celular. O acúmulo de gordura nas glândulas salivares tem sido suportado por três hipóteses: 1) aumento de lipídeos como fonte alternativa de obtenção de energia; 2) endocitose não-específica decorrente da elevação da concentração de ácidos graxos livres circulantes; e 3) redução na formação dos grânulos de secreção salivar e da utilização de gorduras que participam da composição de suas membranas contribuindo para o aumento de gordura intracelular. Além

disso, há uma alteração na proporção de ácidos graxos nas glândulas salivares de ratos diabéticos induzidos por streptozotocina.

O DM1 acarreta perda de peso corpóreo, porém seu efeito sobre o peso glandular é contraditório. Há uma hipótese da insuficiência insulínica exercer efeitos diretos e indiretos sobre a perda de peso das glândulas salivares, pelo comprometimento do metabolismo energético glandular ou pela diminuição nos níveis do hormônio de crescimento, respectivamente (Garret et al., 1998).

Por outro lado, o DM causa uma alteração no metabolismo de carboidratos no fígado e na musculatura esquelética (Libal-Weksler et al., 2001) com reflexos também em tecidos periféricos como as glândulas salivares. Após 30 dias da indução do DM se observa uma diminuição da atividade da hexoquinase na porção solúvel e ligada à mitocôndria da glândula submandibular, enquanto que a glândula parótida apresenta resultados inversos (Nogueira et al., 2005).

Há muitos estudos que mostram alterações nas glândulas salivares de animais ou humanos diabéticos, como por exemplo, pela avaliação do fluxo salivar, análise estrutural, sensibilidade de receptores adrenérgicos ou colinérgicos, resposta à estimulação autônoma e metabolismo energético. Esses resultados são indicativos que levam a pensar que essa enfermidade poderia acarretar uma alteração da composição protéica tanto de glândulas salivares quanto no seu produto de secreção. Porém, os relatos presentes na literatura não apontam um consenso, mas resultados conflitantes que variam de acordo com o parâmetro estudado ou a metodologia empregada.

3. REFERÊNCIAS¹

Acheson, K. J. Carbohydrate for weight and metabolic control: Where do we stand? Nutrition. 26, 141-145, 2010.

¹ As referências da Fundamentação Teórica foram formatadas conforme as normas da ABNT.

Alberti KGMM, Zimmet PZ: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine* 15: 539–553, 1998.

Algandaby MM, Alghamdi HA, Ashour OM, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA and Hajar AS: Mechanisms of the Antihyperglycemic Activity of *Retama raetam* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Food Chem Toxicol.*, 2010.

Ali H, Houghton PJ, Soumynath A: Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. *Journal of Ethnopharmacology* 107:449-455, 2006.

Anderson LC, Garret JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Arch Oral Biol.*49(3):183-91, 2004.

Anderson LC: Parotid gland function in streptozotocin-diabetic rats. *J Dent Res* 66:425-9, 1987.

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

Blum J and Fridovich I: Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 240:500-8, 1985.

Bourey RE, Koranyi L, James DE, Mueckler M and Permutt MA: Effects of altered glucose homeostasis on glucose transporter expression in skeletal muscle of the rat. *J Clin Invest* 86:542-7, 1990.

Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC and Delattre J: Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26:163-76, 2000.

Brownlee M, Cerami A: The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 50: 385-432, 1981.

Caso G, McNurlan MA: Effect of insulin on whole body protein metabolism in children with type 1 diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(1): 93-6, 2010.

Ceriello A: Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49:27-9, 2000.

Changrani NR, Chonkar A, Adeghate E and Singh J: Effects of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on total protein concentrations and cation contents in the isolated pancreas, parotid, submandibular, and lacrimal glands of rats. *Ann N Y Acad Sci* 1084:503-19, 2006.

Chiaasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A and Laakso M: Acarbose for the prevention of Type 2 diabetes, hypertension and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: facts and interpretations concerning the critical analysis of the STOP-NIDDM Trial data. *Diabetologia* 47:969-75; discussion 976-7, 2004.

Costa AA, Almeida JSN: Manual de Diabetes. 4ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2004.

Darnell JA, Saunders MJ. Oral manifestations of the diabetic patient. *Tex Dent J*. 107(2):23-7, 1990.

Dawes C. How much saliva is enough for avoidance of xerostomia? *Caries Res.*38(3):236-40, 2004.

Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Accumulation of Maillard Reaction Products in Skin Collagen in Diabees and Aging. *J Clin Invest.*91:2463-69,1993.

Ferreira ML: Estudo temporal do efeito da administração de tungstato de sódio sobre alguns parâmetros de glândulas salivares e saliva de ratas diabéticas. Tese de Mestrado da Universidade de São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, 109p., 2006.

Foster M, Samman S: Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*, 2010.

Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97-112, 1995.

Garret JR, Ekström J, Anderson LC. Hormonal regulation of salivary glands, with particular reference to experimental diabetes. In: *Glandular mechanisms of salivary secretion. Frontiers of Oral Biology.*Lindor: Karger.Chapter 12, p.200-221,1998.

Genet S, Kale RK and Baquer NZ: Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem* 236:7-12, 2002.

Gonzalez-Clemente JM, Galdon G, Mitjavila J, Minarro A, Gimenez-Perez G, Mauricio D: Translation of the recommendations for the diagnosis of diabetes mellitus into daily clinical practice in a primary health care setting. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 62, 123 -129, 2003.

Gorr SU, Venkatesh SG and Darling DS: Parotid secretory granules: crossroads of secretory pathways and protein storage. *J Dent Res* 84:500-9, 2005.

Gumieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z and Nieradko M: Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 314:39-45, 2001.

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

.

Helkala EL, Niskanen I, Viinamaki H. et al: Short-term and long-term memory in elderly patients with NIDDM. *Diabetes Care*, 18:681-685, 1995.

Hirayama O, Takagi M, Hukumoto K and Katoh S: Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal Biochem* 247:237-41, 1997.

Ihalin R, Loimaranta V, Tenovu J. Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva. *Arch Biochem Biophys*. 445(2):261-8, 2006.

Ishii H, Koya D, et al.: Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76(1): 21-31, 1998.

Jennings PE. The potential of gliclazide, a sulphonylurea to influence the oxidative processes within the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Adv Exp Med Biol* 366: 313-24, 1994.

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

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

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

Kamata M, Shirakawa M, Kikuchi K, Matsuoka T and Aiyama S: Histological analysis of the sublingual gland in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Okajimas Folia Anat Jpn* 84:71-6, 2007.

Knowler WCE, Barrett-Connor, et al.: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6): 393-403, 2002.

Kohda Y, Kanematsu M, Kono T, Terasaki F and Tanaka T: Protein O-glycosylation induces collagen expression and contributes to diabetic cardiomyopathy in rat cardiac fibroblasts. *J Pharmacol Sci* 111:446-50, 2009.

Lee, YS, Lee MH, et al. Enzymatic synthesis of a selective inhibitor for alpha-glucosidases: alpha-acarviosinyl-(1-->9)-3-alpha-D glucopyranosylpropen. *J Agric Food Chem* 56(13): 5324-30, 2008.

Lehninger. Principios de Bioquímica. Integração e regulação Hormonal do Metabolismo dos Mamíferos. 682-710. 3ª.ed, 2002.

Lenzen S: Alloxan and streptozotocin diabetes. In: Peschke E (ed) *Endokrinologie III Vorträge im Rahmen des Projektes 'Zeitstrukturen endokriner Systeme'*. *Endocrinology III lectures within the 'time structures of endocrine systems'*. 23:119–138, 2007.

Levy J, Cobas RA, Gomes MB: Assessment of efficacy and tolerability of once-daily extended release metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Rev. Diabetol Metab Syndr*. 18; 2 (1):16, 2010.

Libal-Weksler Y, Gotlibovitz O, Stark AH, Madar Z. Diet and diabetic state modify glycogen synthase activity and expression in rat hepatocytes. *J Nutr Biochem*.12(8):458-64, 2001.

Lin CC, Sun SS, Kao A, Lee CC: Impaired salivary function in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus with xerostomia. *J Diabetes Complications*.16(2):176-9, 2002.

Lopes JP, Oliveira SM, Soares Fortunato J: Oxidative stress and its effects on insulin resistance and pancreatic beta-cells dysfunction: relationship with type 2 diabetes mellitus complications. *Acta Med Port* 21:293-302, 2008.

Maia FFR, Araújo LR: Aspectos psicológicos e controle glicêmico de um grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 em Minas Gerais. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 48(2), 261-266, 2004.

Maritim AC, Sanders RA, et al: Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 17(1): 24-38, 2003.

Matsunaga Y, Kido H, Kawaji K, Kamoshita K, Katunuma N and Ogura T: Inhibitors of chymotrypsin-like proteases inhibit eosinophil peroxidase release from activated human eosinophils. *Arch Biochem Biophys* 312:67-74, 1994.

McCarthy AD, Etcheverry SB and Cortizo AM: Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol* 38:113-22, 2001.

Mednieks MI, Szczepanski A, et al: Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. *Int J Exp Pathol* 90(4): 412-22, 2009.

Meucci E, Littarru C, Deli G, Luciani G, Tazza L and Littarru GP: Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. *Free Radic Res* 29:367-76, 1998.

Moore S, Calder KA, Miller NJ and Rice-Evans CA: Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. *Free Radic Res* 21:417-25, 1994.

Morales S, garcía-salcedo JA, Muñoz-torres M: Pentosidine: a new biomarker in diabetes mellitus complications. *Med Clin (Barc)*, 2010.

Mizushige K, Noma T, Yao L, Yu Y, Kiyomoto H, Hosomi N, Fukui T, Kimura S, Abe Y and Matsuo H: Effects of troglitazone on collagen accumulation and distensibility of aortic wall in prestage of non-insulin-dependent diabetes mellitus of Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 35:150-5, 2000.

Nathan DM, Davidson MB, et al.: Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care* 30(3): 753-9, 2007.

Nicolau J, Souza DN and Nogueira FN: Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Braz Oral Res* 20:108-13, 2006.

Njolstad PR, Hertel JK, et al.: Progress in diabetes genetics. *Tidsskr Nor Laegeforen* 130(11): 1145-9, 2010.

Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM and Nicolau J: Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 353:133-9, 2005.

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

Oranje WA, Rondas-Colbers GJ, et al.: Lack of effect on LDL oxidation and antioxidant status after improvement of metabolic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 22(12): 2083-4, 1999.

Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, Paquette TL. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 222(4630):1337-9, 1983.

Panneerselvam SR and Govindasamy S: Effect of sodium molybdate on the status of lipids, lipid peroxidation and antioxidant systems in alloxan-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 345:93-8, 2004.

Poornima IG, Parikh P, Shannon RP: Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res*. 98:596-605, 2006.

Relier N, Ruggiero-lopez D, Lecomte M, Lagarde M, Wiernsperger N: In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. *Life Sci.*, 64(17), 1571-83, 1999.

Ribeiro DL: Efeitos da resistência periférica à insulina e do diabetes na próstata ventral de ratos. Tese de doutorado da Universidade Estadual de Campinas: Instituto de Biologia, 92p., 2008.

Sandler S, Andersson AK, et al.: Novel experimental strategies to prevent the development of type 1 diabetes mellitus. *Ups J Med Sci* 105(2): 17-34, 2000.

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

Sharma K, Ziyadeh FN: Biochemical events and cytokine interactions linking glucose metabolism to the development of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 17(2): 80-92, 1997.

Shinde JT, Taldone, et al.: Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res* 343(7): 127, 2008.

Simoes A, Ganzerla E, et al.: Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci* 24(4): 591-6, 2009.

Takaike H, Uchigata Y, et al.: Incidence and development of diabetic microangiopathy of fulminant type 1 diabetes -comparison with non-fulminant type 1 diabetes. *Intern Med* 49(12): 1079-83, 2010

Tenovuo J, Pruitt KM. Relationship of the human salivary peroxidase system to oral health. *J Oral Pathol.* 13(6):573-84,1984.

Tensing EK, Ma J, Hukkanen M, Fox HS, Li TF, Tornwall J, et al.: Protein Kinase C expression in salivary gland acinar epithelial cells in non-obese diabetic mice, an experimental model for Sjogren's syndrome. *Rheumatol Int.* 25(1):28-32, 2005.

Tesch GH, Allen TJ: Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 12(3): 261-6, 2007.

Tiwari AK, Rao, JM: Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals: Present status and future prospects. *Current. Science* 83(1), 30-38, 2000.

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

Tsai EC, Hirsch IB, Brunzell JD and Chait A: Reduced plasma peroxyl radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 43:1010-4, 1994.

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

Uzel N, Sivas A, et al.: Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 19(2): 89-90, 1987.

Vacca Smith AM, Bowen WH. In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol*.45(4):277-91, 2000.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M and Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84, 2007.

van de Laar FA: Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 4(6): 1189-95, 2005.

Vatta MS, Hope SI, Prendes GM, Bianciotti LG, Elverdin JC, Fernandez BE. Salivary glands and noradrenergic transmission in diabetic rats. *Auton Autacoid Pharmacol*. 22(2):65-71, 2002.

Watanabe M, Yamagishi-Wang H, Kawaguchi M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol*.87(2):117-24, 2001.

Wautier JL, Wautier MP, et al.: Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(16): 7742-6, 1994.

Wild S, Roglic G, et al.: Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27(5): 1047-53, 2004.

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C and Tilton RG: Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 42:801-13, 1993.

Yamagishi S and Matsui T: Soluble form of a receptor for advanced glycation end products (sRAGE) as a biomarker. *Front Biosci (Elite Ed)* 2:1184-95, 2010.

CAPÍTULO II

Analysis in the parotid gland of streptozotocin-induced diabetic rats related to alterations of antioxidant biomarkers and collagen type I deposition

RESUMO

A acarbose é um inibidor competitivo das alfa-glicosidases intestinal que retarda a degradação da sacarose e amido, reduzindo a absorção de glicose e frutose. O objetivo deste estudo foi avaliar em glândula parótida de ratos diabéticos o efeito do tratamento da acarbose sobre os parâmetros antioxidantes e deposição de colágeno tipo I. O diabetes foi induzido por injeção intravenosa de estreptozotocina (STZ). Os animais foram distribuídos em quatro grupos (n = 10, cada): controle não-diabéticos (NDM), diabéticos (DM), diabéticos tratados com acarbose a 25 mg / kg (DMA) e controle não diabéticos tratados com acarbose (NDMA). Mudanças no sistema antioxidante enzimático, como a atividade das enzimas SOD e GPx foram avaliados na glândula parótida. Nós encontramos para o grupo DM níveis elevados de enzimas que foram revertidos pelo tratamento com acarbose. O dano tecidual foi mostrado por um aumento da concentração de MDA na glândula parótida do grupo DM, e foi diminuído em 67% com o tratamento de acarbose no grupo DMA. O presente estudo mostrou que a coloração específica das fibras de colágeno tipo I na glândula parótida diferiu em ratos diabéticos e não diabéticos. Estas fibras apresentaram alto grau de marcação na glândula parótida de ratos diabéticos quando comparado ao grupo NDM. O tratamento com acarbose foi capaz de reduzir em 25% a marcação dessas fibras ($p < 0,001$). Estes resultados sugerem que o estado diabético influencia a deposição de colágeno tipo I na glândula parótida em ratos. Em conclusão, pode-se supor que o tratamento com acarbose é útil para evitar o aumento do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia de ratos DM em glândulas parótidas, comparados com ratos diabéticos sem tratamento.

Palavras-chave: diabetes, glândula parótida, estresse oxidativo, acarbose, colágeno tipo I, estreptozotocina.

ANALYSIS IN THE PAROTID GLAND OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC RATS RELATED TO ALTERATIONS OF ANTIOXIDANT BIOMARKERS AND COLLAGEN TYPE I DEPOSITION

Simone Ramos Deconte¹, Renato José da Silva Oliveira¹, Luciana Karen Calábria¹, Vanessa Neves de Oliveira¹, Neire Moura de Gouveia¹, Alberto da Silva Moraes², Foued Salmen Espindola¹

¹*Institute of Genetics and Biochemistry, ²Institute of Biomedical Science, Federal University of Uberlândia, Campus Umuarama, Av. Pará, Bloco 2E, CEP 38400-902, Uberlândia-MG, Brazil.*

Corresponding author:

Foued Salmen Espindola

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica

Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular

Campus Umuarama, Bloco 2E, sala 39A

CEP: 38400-902

Uberlândia, MG, Brazil

fspindola@gmail.com or foued@ufu.br

Phone: (55-34) 3218-2477 and Fax: (55-34)3218-2203

Abstract

Acarbose is a competitive inhibitor of intestinal alpha-glycosidases that slows the breakdown of sucrose and starches, thereby reducing glucose and fructose absorption. The aim of this study was to evaluate in parotid gland of diabetic rats the effect of acarbose treatment on antioxidant parameters and deposition of collagen type I. Diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin (STZ). Animals were distributed in four groups ($n = 10$, each): non-diabetic control (NDM); diabetic (DM); diabetic treated with acarbose at 25 mg/kg (DMA) and non-diabetic control treated with acarbose (NDMA). Changes in enzymatic antioxidant system such as the activity of SOD and GPx enzymes were evaluated in the parotid gland. We found to the DM group high levels of both enzymes that were reverted by acarbose treatment. Tissue damage showed by an increase of TBARS concentration in the parotid gland of the DM group was also reverted in the DMA group. The present study showed that specific stained of the collagen fibers type I in the parotid gland differed from diabetic and non-diabetic rats. These fibers presented high degree of stained in the parotid gland of the diabetic rats when compared to the NDM group. The acarbose treatment was able to reduce in 25% the quantification of these fibers ($p < 0.001$). These results suggest that the diabetic state influences the collagen type I intensity of parotid gland in rats. In conclusion, one may assume that the acarbose treatment is helpful to prevent the increase in oxidative stress induced by hyperglycemia of DM rats in parotid glands, compared with untreated diabetic rats.

Keywords: Diabetes, parotid gland, oxidative stress, acarbose, collagen type I, streptozotocin.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a widespread disease with high morbidity and health care costs [1], which is considered a generalized common chronic metabolic disorder characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion and/or action [2, 3] and certain abnormalities in carbohydrate, fat, electrolyte, and protein metabolism [4]. Due to the high prevalence of this condition, a number of diabetic animal models have been developed and improved over the years, of which rodent models are the most thoroughly described. Thus, injections of alloxan and streptozotocin (STZ) principally induce the same blood glucose and plasma insulin responses and cause an insulin-dependent diabetes syndrome, describing morphological features of beta cell destruction that are characteristic of necrotic cell death [5]. This mechanism is clearly at variance which underlies autoimmune type 1 diabetes, both in humans and rodent models of the disease [5]. Some investigations have described the effects of experimental streptozotocin-induced diabetes [6-12] that elevated blood glucose in 10 days following its injection [11, 13].

Extensive research is still being performed to develop new antidiabetic agents and determine their mechanisms of action [14]. To facilitate diabetes study, oral antihyperglycemic drugs are used, frequently one class of alpha-glucosidase inhibitors [15], as AGIs [16, 17] the acarbose [18-21] is used in the treatment of patients with diabetes. AGIs delay the absorption of carbohydrates from the small intestine and thus have a lowering effect on post prandial blood glucose and insulin levels [22]. On the other hand, persistent hyperglycemia in the diabetic state may cause high production of free radicals in many tissues [23]. These radicals are generated in direct autooxidation process of glucose and protein glycosylation [24]. The relation in parotid gland of diabetic induced-stz rats to reactive oxygen species (ROS) as compared to type I collagen has been few studied.

Under normal condition ROS are neutralized by the antioxidant defense in healthy individuals. Large number of studies have focused on the role of oxidative stress, and it has been reported that this condition may constitute

the key and common event in the pathogenesis of secondary diabetic complications [25]. The increase in the level of ROS in diabetes could be due to increased production and/or decreased destruction by nonenzymatic and enzymatic antioxidant defenses. Catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and superoxide dismutase (SOD) are antioxidant enzymes that critically influences the susceptibility of various tissues to oxidative stress and is associated with the development of complications in diabetes. An enhanced oxidative stress has been observed in diabetic patients as indicated by increased free radical production [26], lipid peroxidation and diminished antioxidant status [8, 27]. Moreover, a correlation among the status of metabolism control, the duration of DM and the severity of induced oxidative stress has been reported [27].

Parotid, submandibular and sublingual glands are the main producers of oral fluid, known as whole saliva. Biochemical alterations in composition and hypofunction of salivary gland have been associated with high fasting blood glucose concentrations. In streptozotocin- and alloxan-induced DM the hyposalivation yields the cytoplasmic accumulation of lipid droplets in terminal secretory end pieces and intercalated duct cells of the three major salivary glands, and it has been correlated with high blood glucose concentration [6, 28].

Glucose has an important role in the accumulation of collagen in tissues (Nicolau, Souza et al. 2006). The hyperglycemic state leads to advanced glycation endproducts (AGEs) formation in the components of the matrix and accelerates the crosslinking of collagen and its deposition in tissues contributes to stiffness in diabetic subjects that alters the structure of the extracellular matrix. Koshda and co-workers (2009) demonstrated that hyperglycemia accelerates the synthesis of collagen type I and III, and Nicolau et al. (2006) suggested that increased hyperglycemia alters the deposition of extracellular matrix proteins in the rat parotid glands, indicating that the diabetic state influences glycogen metabolism in the parotid and salivary rat gland. Although the clinical features of parotid gland in diabetics have been identified, its pathogenesis and, in particular, the mechanisms

underlying the collagen abnormalities in the diabetic parotids are barely known.

Thus, the purpose of this study was to evaluate the antihyperglycemic acarbose effect treatment on parotid glands, and to examine the correlation between the antioxidant status (MDA, TAS, SOD, CAT, GPx) in this tissue on diabetic and diabetic rats treated with acarbose. In addition, these parameters were compared among themselves, in their relationship to anthropometric and biochemical parameters, and influences on collagen type I deposition.

Material and Methods

Animals

Male Wistar rats weighing approximately 160-210 g were acclimatized to the laboratory conditions for a period of two weeks and maintained in a temperature ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and light (12/12 h of light/dark cycle) controlled room. Animals were given standard commercial rat chow and water and housed under standard environmental conditions until treatment or sacrifice. All animal procedures followed the guidelines outlined by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL 2009) and was approved by the Ethics Committee in Animal Research of the Federal University of Uberlandia, Brazil.

Diabetes induction

Diabetes was induced by intravenous injection of streptozotocin (single dose, 40 mg/kg in 0.1 M sodium citrate, pH 4.5 (Sigma-Aldrich, MO, USA). Ten days after the diabetes induction fasting blood glucose (FBG) level was monitored and blood glucose concentration was measured by reactive strips (Biocheck Glucose Test Strip) (Bioeasy, Minas Gerais, Brazil). Rats having a blood glucose level of ≥ 200 mg/dL were considered to be diabetic. After twenty days, control and diabetic rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine and xylazine (1:1), and tissues were dissected. The rats

were distributed randomly in four groups ($n = 10$, each): non-diabetic control (NDM); diabetic (DM); diabetic treated with acarbose at 25 mg/kg (DMA) and non-diabetic control treated with acarbose (NDMA). Treatments were given once daily by gavage during 20 days. All the animals from these groups were sacrificed by euthanasia.

Sample collection

The parotid glands of all the animals were quickly removed, washed with chilled normal saline, weighed and immersed in liquid nitrogen or fixated. The parotid gland weight (in mg) to the body weight (in g) was calculated. Simultaneously, the blood was also collected from the portal vein to confirm the level of blood glucose and serum biochemistry parameters as total cholesterol, plasma triglycerides, total protein, creatinine, urea, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (gamma GT) and alkaline phosphatase, using commercial kits.

Homogenate preparation

The parotid glands were homogenized in buffer containing 40 mM Hepes, 100 mM EDTA, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 1 mM Benzamidina and 0.5 mM PMSF. The tissue homogenates were centrifuged and supernatant was assayed for the activities of oxidative stress markers (10,000 $\times g$ for 10 min at 4 °C). Total protein dosage was carried out using the Bradford method [29].

Oxidative stress markers analysis

Determination of lipid peroxidation product: Lipid peroxidation in plasma was determined by measuring the presence of malondialdehyde (MDA) using the thiobarbituric acid test (TBARS), a commercial kit (Cayman Chemical Inc., MI, USA).

TAS, SOD and GPx activity: Total antioxidant status (TAS), and total activity of the superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) were measured using a commercial kit (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK).

CAT activity: Catalase (CAT) activity was assayed spectrophotometrically monitoring hydrogen peroxide decomposition at 240 nm [30] and the substrate concentration was 20 mM for parotid gland measurements.

Histology and measurement of collagen

Parotid glands were fixed with 10% formaldehyde solution in phosphate-buffered saline 0.1 M, pH 7.4 for 24 h, dehydrated in ethanol, cleared in xylene and embedded in paraffin. Five micrometer sections were cut and mounted on gelatin-chrome aluminum-coated microscope slides. To evaluate morphology of parotid gland, sections were stained by hematoxylin and eosin method (H.E.). For analysis and determination of percentage of conjunctive tissue, sections were stained by Picrosirius red method [31, 32], sections were hydrated, washed in phosphomolibdic acid 0.2% , followed by 90 min in Sirius red and saturated aqueous solution of picric acid 0.1%, and sections were dehydrated. Morphometric analysis was carried out using a light microscope (Olympus Ltd., Hertfordshire, UK) with 40x objective equipped with a capture-and-image-analysis system (HL-Image 97, Western Vision Software, Utah, USA). Thirty random fields within those areas with a higher proportion of staining were selected. Percentage of collagen type I pixels per area was measured in each field analyzed.

Statistical analysis

The data were analyzed using the SigmaStat 3.5 software (Systat Software Inc., IL, USA). Means and standard deviations were calculated. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the values among groups. A p value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

The mean blood glucose concentration of the DM was higher than DMA (17%), followed to lower values of NDM and NDMA groups (Table 1). The average blood glucose of the DM group was 315% higher ($p < 0.001$)

compared to NDM and NDMA, which was 71% lower ($p < 0.001$) compared to DMA animals, however this group had their values decreased 17% compared to DM.

The body weight and the parotid gland weight are shown in Table 1. The mean of final body weight of the NDM had increased, and the mean body weight of the DM animals decreased 12% ($p < 0.05$) after 20 days of treatment. DMA had a decrease value of 6% ($p < 0.05$) compared to NDM group. However, NDM and NDMA groups maintained their average body weight. Acarbose treatment managed to keep the animal weights closer to the values of NDM and NDMA groups. Twenty days of treatment was not able to modify parotid gland weight into those groups. This data showed that the relative glandular weight tend to be higher in DM then NDM, followed to NDMA and DMA groups. STZ-induced diabetes had no significant effects ($p > 0.05$) on glandular total protein content, although values was decreased in DM and DMA compared to NDM and NDMA (Table 1).

Alkaline phosphatase values were 359% higher ($p < 0.001$) to DM than NDM and NDMA groups (Table 1). A significant increase was found to DMA compared to NDM and NDMA ($p < 0.001$). DMA had their values reduced by 11% compared to DM group. Also, we observed an increase of 61% in the levels of gamma-GT to DM rats compared to NDM and NDMA. Treatment with acarbose decreased gamma-GT levels (36%) when compared with DM group.

Alanina aminotransferase (ALT) had levels increased by 94% ($p < 0.001$) in DM compared to NDM and NDMA. Treatment with acarbose was capable of decrease ALT levels in 12% presenting statistic difference to NDM (Table 1). Likewise, urea values were higher ($p < 0.001$) to DM and DMA groups than NDM and NDMA. Treatment with acarbose in DMA rats decrease 9% of urea values comparing to DM group.

Creatinine and triglycerides maintained their values during this data for all groups of treatment. Also, cholesterol and AST not showed statistical difference ($p > 0.05$), although we can notice for both parameters a subtle increase to DM groups.

Comparison of biomarkers of oxidative stress within the rat groups revealed some trends to parotid gland (Figure 1).MDA levels were significantly increased in DM group (134%) compared to all other groups ($p<0.001$). Acarbose treatment decreased MDA levels until reach to NDM pattern. The mean of SOD activity to DM group was significantly 46% higher than all other groups presenting statistic difference ($p < 0.05$) to NDM group. Besides, DMA had SOD activity values 15% lower compared to DM group. Similarly to SOD, Gpx was measured and the results showed an increase (11%) in DM group compared to NDM and DMA ($p<0.001$). Acarbose treatment was again able to reduce Gpx (8%) compared to DM group. TAS and CAT activity had no significant difference among groups ($p>0.05$).

Parotid gland tissue stained with H.E. was analyzed by light microscopy in order to define the limiting membrane of acini in more detail (Figure 2). DMA showed an intermediate pattern of demarcation between the acini of compared to NDM and DM. Moreover, the acini are more spaced in tissue DM compared to NDM and better collagen deposition in DM than other group animals. NDMA presented the same morphology of NDM group. The collagen fibers stained on the parotid tissue differentially were compared between DM and NDM groups. Type I collagen was found around ducts, acini, and nerves as well as in the walls of arteries and veins. The staining pattern in DM group was a thick and intense sleeve as a deposit around ducts and thin linear positivity around acini and nerves. Increased fiber staining was more evident in the DMA group compared with NDM, and showed intermediate levels of deposition, compared with DM.

Discussion

DM is a metabolic disease that affects many organs and systems, including the oral cavity. In salivary glands alterations in the glycolytic enzymes activities [33, 34], antioxidant parameters [27, 35] of the salivary glands have also been reported to diabetic rats. These alterations also are related with an increased collagen deposition as described by Kohda et al. (2009) in heart of diabetic rats.

The results of this investigation have shown marked differences in the characteristics of the DM and DMA rats compared to healthy animals (NDM, NDMA). In this study, we found that 20 days after STZ-induced diabetes caused changes in enzymatic antioxidant system in the parotid gland of rats, in the activity of SOD and GPx enzymes, specially. Blood glucose levels remained elevated after the 20 days of the assay. NDM and NDMA rats gained significantly weight compared to DM and DMA, probably DM lost weight by a metabolic issue, specially if the animal can not absorb glucose then it starts to get ATP from other sources due to the lack of insulin.

Based on the results we observed the most striking fact of DM is hyperglycemia. Comparing the DM with the NDM rat, we have an extreme variation in the amount of glucose, being highly marked in the DM group. The DMA results agree with Van de Laar et al (2005) that described a clear effect of acarbose treatment on glycemic control. Furthermore, a higher rate of gluconeogenesis is facilitated by unrestricted proteolysis, contributing to loss of weight. Another striking point in the differences between DM and DMA is in the same period of time, the diabetic rats lost weight dramatically, while the NDM and NDMA rats gained. This can be due to proteolysis and reduction of adipose tissue present in diabetic rats data confirmed by the loss of fat observed in DM rats during the sacrifice. The parotid gland weights had no significant variation between groups, although a decrease pattern in DM and DMA values was noticed just like body weight, probably due to the fact that exist a positive correlation between gland weight and body weight ($r = 0.95$). Our results agree with Nicolau et al. (2006) that calculated relative glandular weight and showed a higher value for the parotid gland in comparison with the control.

Moreover, our results agree with data reported by Nogueira et al. (2005), that focused on the correlation aspect between the diabetic state and the antioxidants of the salivary glands of rats, showing that TBARS detection reflects the effects of damage in cells. In this study, a significant increase of MDA was observed in the plasma of DM group compared to other groups. This finding agree with Nicolau et al. (2009) who found greater MDA index in the salivary gland of diabetic animals indicating an oxidative stress, which

may have affected the activity of the enzyme, in contrast to acarbose treatment that was able to decrease this damage resulted by DM condition.

In the present study, the elevation in the antioxidant enzyme activities SOD and GPx in DM rats of both enzymes was analyzed. Decreasing rates in DMA animals is probably consequence of a protective effect of the treatment with acarbose. Our data show that there is a positive correlation between SOD, GPx and MDA which are consistent with an increase in antioxidant enzymes such as SOD, and GPx in DM as result of an increased reactive oxygen species production [36]. SOD concentration of the DM is significantly higher than other groups. In the enzymatic salivary antioxidant system, peroxidase is by far the most important enzyme. An increase in SOD activity in diabetic animals is possibly due to increase dismutation of superoxide anion to molecular oxygen and hydrogen peroxide as an adaptive response to increased oxidative stress [37]. We have found higher specific activity of GPx for the DM rat parotid glands than NDM as showed in plasma by [38]. The present GPx parotid data agrees with Nogueira et al (2005).The GPx results reported for diabetic tissues are somewhat different. Its activity results is lower in liver, [39, 40], in kidney [39], and in muscle [41]. No difference was observed in the reports for heart and brain [40].

We have found that in the parotid gland, no difference in the specific activity of CAT was observed, as previously reported in diabetic kidney [40]. The activity of this enzyme in some tissues of diabetic animals was reported to be higher in muscle [41], in heart, and brain [42], and lower in liver [39, 40]. The decrease in antioxidant enzymes in some tissues during diabetes may be due to the inactivation or inhibition of the enzymes by the increased production of oxygen free radicals during diabetes [43, 44]. Furthermore, in this study we observed that acarbose treatment maintained reduced the CAT activity after 20 days of treatment. No difference was found to TAS analysis, a hypothesis is that parotid gland presents an aerobic metabolism [45, 46] and therefore, can be naturally prepared to prevent oxidative damage caused by reactive oxygen species [47].

Typical serum biochemical parameters, such as alkaline phosphatase, found elevated in our study, are often tested to evaluate whether the liver is damaged or diseased and has been previously reported in type 1 diabetes [48-50]. Our data shows plasma level of ALT, increased after the onset of DM. On the other hand, treatment of DMA rats caused partial reduction in the activity of these enzymes in plasma when compared to the DM by scavenging or neutralizing free radicals, interacting with oxidative cascade, quenching oxygen, inhibiting oxidative enzymes and peroxidation of membrane lipids and maintains cell membrane integrity and their functions [51, 52]. Another parameter analyzed was urea, an increase of urea levels for DM group also was observed by [53] and [54]. However, urea levels had a slight reduction in DMA after 20 days, and this means that this administration has some beneficial effect on kidney functions [55]. The plasma urea levels contribute to firm damages due to abnormal glucose regulation, including elevated glucose and glycosylated protein tissue levels, and increased oxidative stress [53].

Light microscopic studies of parotid glands showed marked differences in the macrostructural morphology of the diabetic and treated diabetic by hematoxylin and eosin and picosirius red methods. In H.E. sections, DM parotid glands showed to be extensively infiltrated with lipid droplets of various magnitudes. In contrast, NDM animal glands display normal macrostructural properties, with little or no distribution of lipid droplets. In the present investigation picosirius red staining showed that the content of collagen type I increased in parotid of DM animals is in agreement with the findings of heart and kidney studies of STZ-diabetic rats [56]. Moreover in our experimental model the deposition of collagen was reduced with acarbose treatment which presented a H.E. and collagen staining morphology were similar to NDM group. The collagen type I pattern in DM rat parotid glands is barely known about diabetes behavior which may affect the structure and acini function compromising functions that can be attributed to altered collagen type I deposition in parotid tissue. It was also possible to identify in the sections of DM groups clear granule-like structures that appeared to be lipid droplets [6]. These findings suggest that parotid gland

cells become dysfunctional during insulin dependent DM. Acarbose treatment was able to reduce part of the damage caused for this condition, causing a reduction in the size and number of lipid droplets, as well as in a partial reversal of biochemical changes, as shown in picrosirius red staining pattern. Our data was the positive correlation between collagen type 1 and oxidative parameters as also suggested by [57] who reported increased levels of glycoxidation products in collagen that can be attributed to the increase in glycation and in the oxidative stress. We observed in this study that morphological finding in the rat parotid glands are correlated to biochemistry parameters that reinforce the relevance of acarbose treatment, to attenuate alterations of the disease severity.

In conclusion, one may assume that the acarbose treatment showed antioxidant capacity in the parotid glands when compared to untreated diabetic rats. It is suggested picrosirius red staining technique in parotid gland to assess collagen type I deposition in DM and to compare to antioxidant treatments. Acarbose treatment is effective in the reduction of oxidative stress in parotid gland and is also important to note the positive correlation of type I collagen to oxidative stress. Further studies are necessary to evaluate collagen type I deposition in different treatment periods.

Acknowledgements

This work was supported by grants from FAPEMIG to FSE, by CAPES fellowship to SRD, RJSO and LKC, by CNPq fellowship to NMG. The authors thank the School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, Prof. Dr. Antonio Vicente Mundim for taking time on many occasions to discuss our data with us, and lab technician Felipe Cezar Gonçalves for his help in processing the biochemical analyses, and Fabiana Barcelos Furtado and Fernanda Viera Alves for taking care of rats and diabetes induction.

Figure legends

Figure 1 – Effect of STZ-induced diabetes and acarbose treatment in parotid gland of rat on the levels of oxidative parameters. Bar charts showing relative percentage values of oxidative analysis in parotid gland of the NDM, DM DMA and NDMA animal groups. Data are mean $\pm$ SEM. malondialdehyde concentration (**TBARS**); total antioxidant status (**TAS**); total activity of the superoxide dismutase (**SOD**); catalase (**CAT**); glutathione peroxidase (**GPx**). Glutathione peroxidase values $\times 10^3$. (**a**) $p < 0.001$ vs. NDM, (**b**) $p < 0.001$ vs. NDMA, (**c**) $p < 0.001$ vs. DMA, (**d**) $p < 0.05$ vs. NDM. $n = 10$ rats for each group.

Figure 2 – Effect of the STZ-induced diabetes and acarbose treatment in Collagen type I fiber deposition on the rats parotid glands. Collagen stain (**A,C,E,G**) and H.E. (**B,D,F,H**). In DM group the intensity of type I collagen stain increased around acini compared to NDM group. On the other hand, DMA showed an intermediate staining. Bar = 50 μ m. Graphic representation of collagen quantification between acini of parotid glands NDM, DM, DMA and NDMA rats (**a**) $p < 0.001$ vs. NDM, (**b**) $p < 0.001$ vs. NDMA, (**c**) $p < 0.001$ vs. DMA. Bar represent mean $\pm$ S.E.M.

Figures

Figure 1

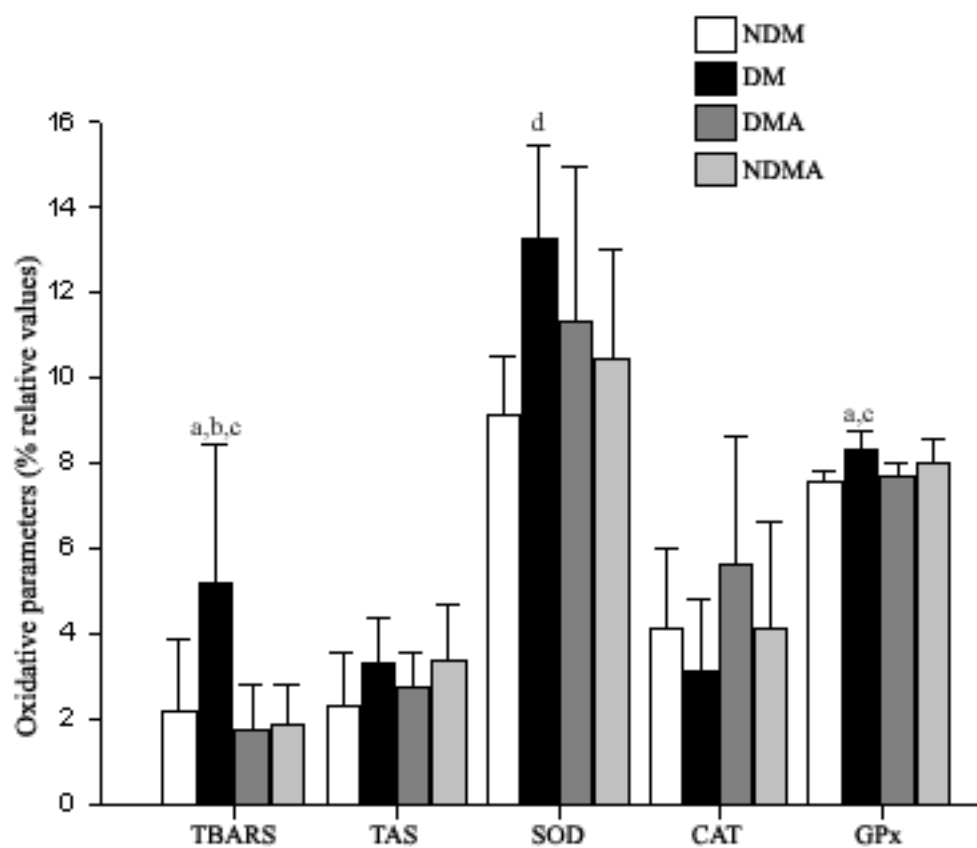
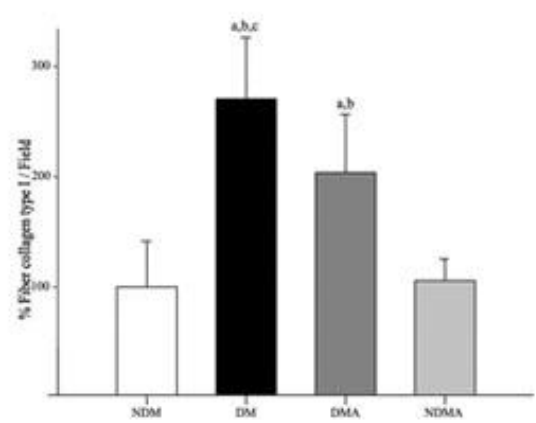
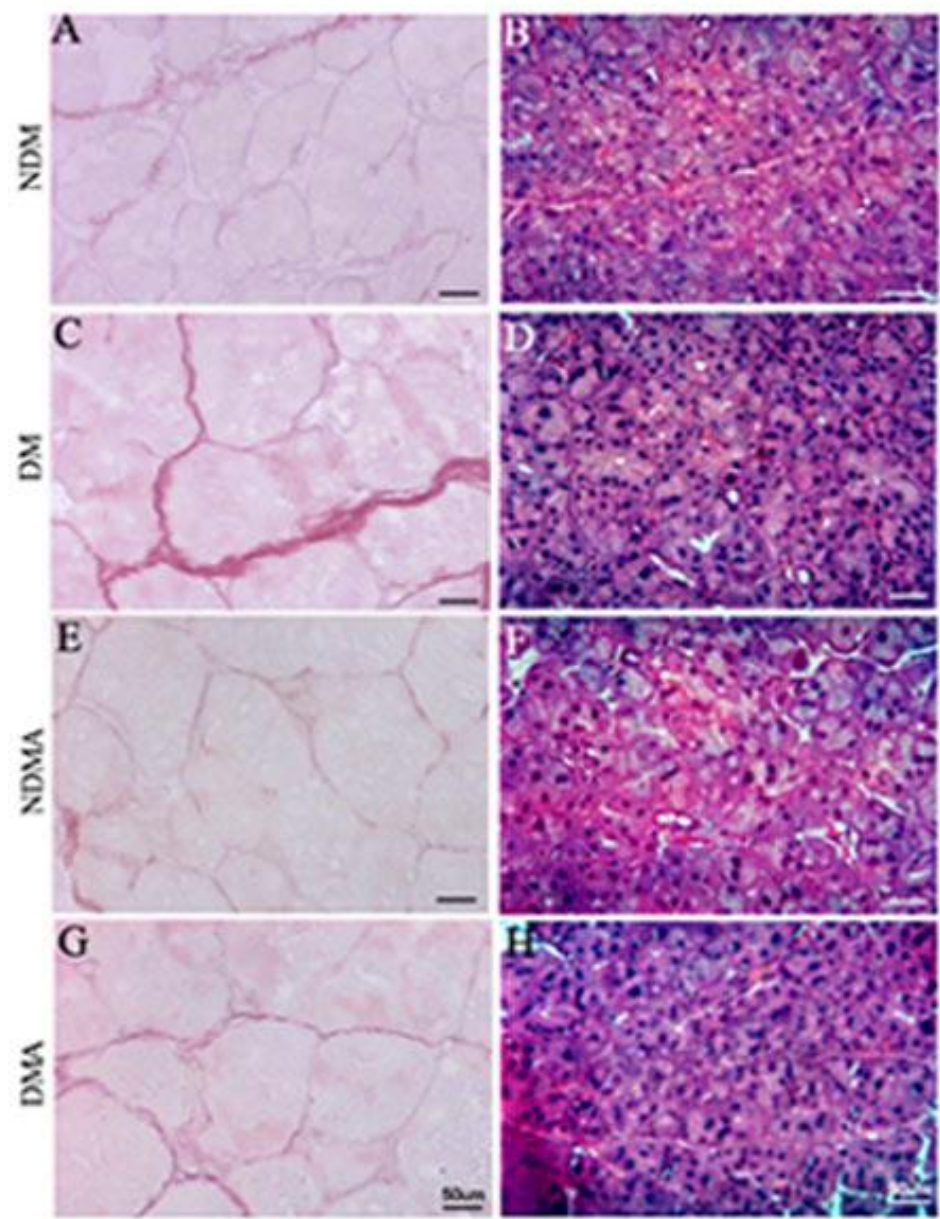


Figure 2



Table

Table 1 - Anthropometric and biochemistry parameters of NDM, DM, DMA and NDMA. All parameters had used serum samples, except to glycemia values that were used total blood concentration. Gamma-glutamyltransferase (**Gamma-GT**); Aspartate Aminotransferase(**AST**); Alanine Aminotransferase(**ALT**).

	NDM	DM	DMA	NDMA
Glycemia (mg/dL)	115.60±6.88	479.60±42.07 ^{a,b}	401.70±47.63 ^{a,b}	118.40±7.92
Body weight (g)	305.60±6.86	271.60±5.48 ^{c,d}	287.60±9.10	305.00±8.09
Gland weight(mg)	92.80±4.07	83.30±4.33	78.20±11.41	85.33±7.41
Gland/Body weight(mg/g)	0.30±0.01	0.31±0.02	0.27±0.04	0.28±0.03
Protein content (µg/µL)	2.23±0.09	2.15±0.12	2.16±0.14	2.29±0.10
Alkaline phosphatase (U/L)	133.21±14.23	610.92±43.77 ^{a,b}	548.98±142.39 ^{a,b}	158.47±16.94
Cholesterol (mg/dL)	62.32±4.48	69.46±3.93	69.99±6.03	64.66±3.41
Creatinine (mg/dL)	0.68±0.04	0.74±0.03	0.63±0.04	0.64±0.04
Gamma GT (U/L)	5.78±1.01	9.28±0.63 ^{a,b,e}	5.96±0.67	4.93±0.41
AST (U/L)	117.90±15.86	130.50±13.60	143.30±22.13	116.40±9.00
ALT (U/L)	50.30±4.28	97.90±6.28 ^{a,b}	86.90±11.44 ^a	59.60±5.34
Triglycerides (mg/dL)	74.05±13.77	157.36±36.11	133.10±32.03	81.16±23.38
Urea (mg/dL)	37.98±2.36	77.31±4.64 ^{a,b}	71.11±6.63 ^{a,b}	44.88±2.88

Data are expressed as means ± SEM. *n* = 10 rats for each group

^a *p*<0.001 vs. **NDM**, ^b *p*<0.001 vs. **NDMA**, ^c *p*<0.05 vs. **NDM**, ^d *p*<0.05 vs. **NDMA**, ^e *p*<0.001 vs. **DMA**.

References²

- [1] Mednieks MI, Szczepanski A, Clark B, Hand AR. Protein expression in salivary glands of rats with streptozotocin diabetes. *Int J Exp Pathol* 2009; 90:412-422.
- [2] Mitrovic M, Pantelinac P, Radosavljevic J, Bajkin I, Todorovic-Dilas L. [The role of insulin analogues in the current treatment of diabetes mellitus]. *Med Pregl* 2006; 59:539-544.
- [3] Unger J, Parkin CG. Type 2 diabetes: an expanded view of pathophysiology and therapy. *Postgrad Med*; 122:145-157.
- [4] Kumar P, Clark M. Diabetes mellitus and other disorders of metabolism. In: Clark PKM, editor. *Clinical Medicine*: WB Saunders 2002.: 1069–1121.
- [5] Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008; 51:216-226.
- [6] Anderson LC. Parotid gland function in streptozotocin-diabetic rats. *J Dent Res* 1987; 66:425-429.
- [7] Simoes A, de Oliveira E, Campos L, Nicolau J. Ionic and histological studies of salivary glands in rats with diabetes and their glycemic state after laser irradiation. *Photomed Laser Surg* 2009; 27:877-883.
- [8] Ugochukwu NH, Cobourne MK. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. *Clin Chim Acta* 2003; 336:73-81.
- [9] Algandaby MM, Alghamdi HA, Ashour OM, et al. Mechanisms of the Antihyperglycemic Activity of *Retama raetam* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Food Chem Toxicol*.
- [10] Xiang X, Wang Z, Zhu Y, Bian L, Yang Y. [Dosage of streptozocin in inducing rat model of type 2 diabetes mellitus]. *Wei Sheng Yan Jiu*; 39:138-142.
- [11] Changrani NR, Chonkar A, Adeghate E, Singh J. Effects of streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus on total protein concentrations and cation contents in the isolated pancreas, parotid, submandibular, and lacrimal glands of rats. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084:503-519.
- [12] Zhang Z, Wu F, Zheng F, Li H. Adenovirus-Mediated Decorin Gene Transfection Has Therapeutic Effects in a Streptozocin-Induced Diabetic Rat Model. *Nephron Exp Nephrol*; 116:e11-e21.
- [13] Bourey RE, Koranyi L, James DE, Mueckler M, Permutt MA. Effects of altered glucose homeostasis on glucose transporter expression in skeletal muscle of the rat. *J Clin Invest* 1990; 86:542-547.
- [14] Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2007; 12:261-266.

² As referências do Capítulo 1 foram formatadas conforme as normas da Clinica Chimica Acta.

- [15] Nathan DM, Davidson MB, DeFronzo RA, et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes Care* 2007; 30:753-759.
- [16] van de Laar FA. Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4:1189-1195.
- [17] Godbout A, Chiasson JL. Who should benefit from the use of alpha-glucosidase inhibitors? *Curr Diab Rep* 2007; 7:333-339.
- [18] Shinde J, Taldone T, Barletta M, et al. Alpha-glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel in vitro and in Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydr Res* 2008; 343:1278-1281.
- [19] Lee YS, Lee MH, Lee HS, et al. Enzymatic synthesis of a selective inhibitor for alpha-glucosidases: alpha-acarviosinyl-(1-->9)-3-alpha-D-glucopyranosylpropen. *J Agric Food Chem* 2008; 56:5324-5330.
- [20] Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346:393-403.
- [21] Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for the prevention of Type 2 diabetes, hypertension and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: facts and interpretations concerning the critical analysis of the STOP-NIDDM Trial data. *Diabetologia* 2004; 47:969-975; discussion 976-967.
- [22] Van de Laar FA, Lucassen PL, Akkermans RP, Van de Lisdonk EH, De Grauw WJ. Alpha-Glucosidase Inhibitors for Patients With Type 2 Diabetes: Results from a Cochrane systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2005; 28:154 - 163.
- [23] Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1995; 151:113-119.
- [24] Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000; 26:163-176.
- [25] Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000; 49:27-29.
- [26] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84.
- [27] Nogueira FN, Carvalho AM, Yamaguti PM, Nicolau J. Antioxidant parameters and lipid peroxidation in salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2005; 353:133-139.
- [28] Kamata M, Shirakawa M, Kikuchi K, Matsuoka T, Aiyama S. Histological analysis of the sublingual gland in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2007; 84:71-76.
- [29] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
- [30] Aebi H, Suter H, Feinstein RN. Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem Genet* 1968; 2:245-251.

- [31] Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979; 11:447-455.
- [32] Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG. Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 1994; 89:397-410.
- [33] Nicolau J, Souza DN, Nogueira FN. Activity, distribution and regulation of phosphofructokinase in salivary gland of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Braz Oral Res* 2006; 20:108-113.
- [34] Nogueira FN, Santos MF, Nicolau J. Influence of streptozotocin-induced diabetes on hexokinase activity of rat salivary glands. *J Physiol Biochem* 2005; 61:421-427.
- [35] Simoes A, Ganzerla E, Yamaguti PM, de Paula Eduardo C, Nicolau J. Effect of diode laser on enzymatic activity of parotid glands of diabetic rats. *Lasers Med Sci* 2009; 24:591-596.
- [36] Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998; 21:1736-1742.
- [37] Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240:500-508.
- [38] Qujeq D, Aliakbarpour HR, Kalavi K. Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2004; 340:79-83.
- [39] Panneerselvam SR, Govindasamy S. Effect of sodium molybdate on the status of lipids, lipid peroxidation and antioxidant systems in alloxan-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta* 2004; 345:93-98.
- [40] Genet S, Kale RK, Baquer NZ. Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). *Mol Cell Biochem* 2002; 236:7-12.
- [41] Gumieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z, Nieradko M. Differences in antioxidant status in skeletal muscle tissue in experimental diabetes. *Clin Chim Acta* 2001; 314:39-45.
- [42] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97-112.
- [43] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1974; 47:469-474.
- [44] Kakkar R, Mantha SV, Kalra J, Parsad K. Time course study of oxidation stress in aorta and heart of diabetic rat. *Clin Sci* 1996; 91:441-448.
- [45] Nicolau J, Sasaki KT. Metabolism of carbohydrate in the major salivary glands of rats. *Arch Oral Biol* 1976; 21:659-661.
- [46] Nicolau J, De Souza DN, Simoes A. Alteration of Ca(2+)-ATPase activity in the homogenate, plasma membrane and microsomes of the salivary glands of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2009; 27:128-134.
- [47] Leite MF, Lima AM, Massuyama MM, Otton R. Astaxanthin restores the enzymatic antioxidant profile in salivary gland of alloxan-induced diabetic rats. *Arch Oral Biol*.

- [48] Arkkila PE, Koskinen PJ, Kantola IM, Ronnema T, Seppanen E, Viikari JS. Diabetic complications are associated with liver enzyme activities in people with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2001; 52:113-118.
- [49] Nannipieri M, Gonzales C, Baldi S, et al. Liver enzymes, the metabolic syndrome, and incident diabetes: the Mexico City diabetes study. *Diabetes Care* 2005; 28:1757-1762.
- [50] Li M, Ding W, Smee JJ, Baruah B, Willsky GR, Crans DC. Anti-diabetic effects of vanadium(III, IV, V)-chlorodipicolinate complexes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biometals* 2009.
- [51] Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 1992; 111:117-124.
- [52] Reddy BV, Sundari JS, Balamurugan E, Menon VP. Prevention of nicotine and streptozotocin treatment induced circulatory oxidative stress by bis-1,7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2009; 331:127-133.
- [53] Kaleem M, Medha P, Ahmed QU, Asif M, Bano B. Beneficial effects of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Med J* 2008; 49:800-804.
- [54] Garg GR, Khanna N, Mehta KD, et al. Modulation of Oxidative Stress, Serum Lipids and Renal Dysfunction by Benazepril in Diabetes Mellitus. *JK Science* 2010; 12.
- [55] Amin A, Lotfy M, Shafiullah M, Adeghate E. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084:391-401.
- [56] Fujisawa G, Okada K, Muto S, et al. Spironolactone prevents early renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 2004; 66:1493-1502.
- [57] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-412.