

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO” (UNESP)
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA (FOA)
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

DAMÁRIS RAISSA DOS SANTOS

**Impacto da orquiectomia e terapia de reposição hormonal
com cipionato de testosterona no estresse oxidativo e
função secretora das glândulas salivares de ratos Wistar**

DAMÁRIS RAISSA DOS SANTOS

**Impacto da orquiectomia e terapia de reposição hormonal
com cipionato de testosterona no estresse oxidativo e
função secretora das glândulas salivares de ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Antonio Hernandez Chaves Neto

Coorientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Araçatuba

2020

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237i Santos, Damáris Raissa dos.
Impacto da orquiectomia e terapia de reposição hormonal com cipionato de testosterona no estresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares de ratos Wistar / Damáris Raissa dos Santos. - Araçatuba, 2021
53 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Antonio Hernandes Chaves Neto
Coorientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Saliva 2. Orquiectomia 3. Estresse oxidativo
4. Testosterona 5. Glândulas salivares I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

*Aos meus eternos amores, meus pais **Valdeni e Luziene**, avós **Edna Rosa e Gerulina**, que mesmo de longe, deram todo o apoio e força para a concretização deste trabalho.*

*Ao meu esposo, amigo, confidente e companheiro em todos os momentos, **Luis Fernando**.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bençãos concedidas e força diante de tantos momentos que enfrentei.

Ao meu esposo, Luís Fernando Gadioli, que foi meu ponto de equilíbrio, ombro amigo e companheiro em todo o tempo, eu te amo!

A minha família, em especial meus irmãos, tios e tias que torceram e oraram por mim.

A minha cunhada, Bruna Gadioli que por diversas vezes, assumiu papel de mãe, cuidadora, professora e orientadora durante o mestrado.

As minhas amigas e confidentes Jéssica Zanardo, Bruna Tavares, Fernanda Fernandes e Rayne Oliveira, por me ajudarem emocionalmente e me darem forças em tantos momentos desafiadores. Minha eterna gratidão e admiração por vocês!

Aos discentes e egressos do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela amizade e companheirismo.

Aos alunos de iniciação científica e hoje, grandes amigos, Gabriela e Arthur, por compartilharem comigo tantos conhecimentos, e por se empenharem na execução deste trabalho! Vocês são tão donos deste trabalho quanto eu. Admiro vocês!

Ao grupo de pesquisa do Professor Antonio: Matheus Cipriano, Guilherme, Ana Carolina, Marcelo, Henrique Arnaldo, Marco Aurélio pela contribuição em diversos momentos.

Aos alunos da Professora Rita, Luis Fernando, Angela e Fernanda por nos ensinarem várias técnicas e cederem materiais e equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao Professor Marcelo Macedo e a Gisele Mitsuy pela colaboração durante todo o processo da análise histológica.

Aos Professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, Ana Cláudia, Cristina Antoniali, Rita Dornelles, Sandra, Dóris e João pela ajuda, colaboração e aprendizado durante esta jornada.

A todos os demais funcionários do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, cujos trabalhos são essenciais para o bom funcionamento desta universidade. Em especial aos senhores Camilo, João e Arnaldo responsáveis pelo Biotério Central, e a Dona Marcia Castellani que foi como uma mãe, sempre cuidando, organizando, aconselhando e sempre cheia de carinho durante todos esses anos.

Ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado (Número do processo: 133203/2019-0).

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de poder realizar e concluir o Mestrado.

Pró-Reitora de Pós-Graduação da UNESP (PROPG/UNESP), pelo apoio financeiro nas viagens para realização das disciplinas.

Ao meu orientador, Professor Antonio Hernandes, que me abriu as portas em 2015, e sempre me incentivou, orientou e ensinou. Toda a cobrança e rigidez me fizeram evoluir no conhecimento científico. Admiro como ser humano e profissional.

Pois o Espírito que Deus nos deu não nos torna medrosos; pelo contrário, o Espírito nos enche de poder e de amor e nos torna prudentes.

2 Timóteo 1:7

SANTOS, D. R. **Impacto da orquiectomia e da terapia de reposição hormonal com cipionato de testosterona no estresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares de ratos Wistar. 2020.** 53 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

Apesar da comprovada capacidade da testosterona (T) em modular o estresse oxidativo de forma tecido-específica, pouco se sabe se as glândulas salivares estão sujeitas a essa modulação. O objetivo foi investigar os efeitos da orquiectomia (OQX) e da terapia de reposição hormonal (TRH) com T no estresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares. Ratos Wistar (3 meses de idade) foram randomizados em 3 grupos (n = 15 ratos/grupo): simulação de cirurgia (SHAM); OQX; e OQX tratado com cipionato de testosterona (CT). A TRH com T foi realizada por via intramuscular, semanalmente, com 10 mg/kg de massa corpórea de CT por 4 semanas, iniciando 4 semanas após a OQX. Após o tratamento, o fluxo salivar (FS) induzido por pilocarpina foi coletada e as glândulas parótidas (PA) e submandibulares (SM) foram armazenadas a -80 °C e submetidas a posteriores análises bioquímicas e histomorfométricas. O FS e as concentrações de cálcio, fosfato e cloreto aumentaram no grupo OQX. Após a OQX diminuíram a proteína total (PT) e a atividade da amilase (AMI), enquanto não houve nenhuma alteração na capacidade tamponante, pH, sódio e potássio na saliva. A concentração de PT e atividade de AMI aumentaram no grupo CT, enquanto que as concentrações de fosfato e cálcio reduziram na saliva em comparação com o grupo OQX. Proteína carbonilada, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, capacidade antioxidante total, ácido úrico e glutathione total aumentaram no grupo OQX em ambas as glândulas salivares. Superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase aumentaram após a OQX na glândula SM, porém nenhuma alteração nas enzimas antioxidantes foi observada na glândula PA. A área ductal e acinar diminuíram e a área de tecido conjuntivo aumentou na glândula PA após a OQX. A área ductal diminuiu e a área acinar aumentou na SM, entretanto, não houve alteração na área de tecido conjuntivo após a OQX. A TRH com CT restaurou todos os parâmetros para níveis próximos ao grupo SHAM. Conclui-se que a OQX modula o estresse oxidativo nas glândulas salivares, e pode afetar a secreção e composição da saliva.

Palavras-chave: Saliva. Orquiectomia. Estresse oxidativo. Testosterona. Glândulas salivares.

SANTOS, D. R. **Impact of orchietomy and cypionate testosterone replacement on stress oxidative and salivary gland function in Wistar rats.** 2020. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Despite the proven ability of testosterone (T) to modulate oxidative stress in a tissue-specific manner, little is known whether the salivary glands are subject to this modulation. The objective was to investigate the effects of orchietomy (ORX) and hormone replacement therapy (HRT) with T on oxidative stress and secretory function of the salivary glands. Wistar rats (3 months old) were randomized into 3 groups (n = 15 rats / group): surgery simulation (SHAM); ORX; and ORX treated with testosterone cypionate (TC). HRT with T was performed intramuscularly (I.M.), weekly, with 10 mg/kg body weight of TC for 4 weeks, starting 4 weeks after ORX. After treatment, the salivary flow (FS) induced by pilocarpine was collected and the parotid (PA) and submandibular (SM) glands were stored at -80 °C and subjected to subsequent biochemical and histomorphometric analyzes. FS and calcium, phosphate and chloride concentrations increased in the ORX group. After ORX, total protein (TP) and amylase activity (AMY) decreased, while there was no change in buffering capacity, pH, sodium and potassium in saliva. The TP concentration and AMY activity increased in the TC group, while the phosphate and calcium concentrations decreased in saliva compared to the ORX group. Carbonylated protein, thiobarbituric acid reactive substances, total antioxidant capacity, uric acid and total glutathione increased in the ORX group in both salivary glands. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase increased after ORX in the SM gland, but no changes in antioxidant enzymes were observed in the PA gland. The ductal and acinar area decreased and the area of connective tissue increased in the PA gland after ORX. The ductal area decreased and the acinar area increased in SM, however, there was no change in the connective tissue area after ORX. HRT with TC restored all parameters to levels close to the SHAM group. It is concluded that ORX modulates oxidative stress in the salivary glands, and can affect the secretion and composition of saliva.

Keywords: Saliva. Orchietomy. Oxidative stress. Testosterone. Salivary glands.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Imagem ilustrativa da posição anatômica das glândulas salivares em humanos (A) e roedores (B).....	17
Figura 2 – Cortes histológicos da glândula PA de camundongos (A) e humano (B)	18
Figura 3 – Corte histológico da glândula SM de camundongos macho (A) e fêmea (B).....	19
Figura 4 – Fluxograma esquemático do estudo	24
Figura 5 – Efeito da OQX e CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares.....	31
Figura 6 – Efeito da OQX e CT no fluxo salivar e parâmetros bioquímicos salivares.....	33
Figura 7 – Efeito da OQX e CT no dano oxidativo proteico e lipídico nas glândulas salivares	34
Figura 8 – Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante não – enzimática nas glândulas salivares.....	35
Figura 9 – Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante enzimática nas glândulas salivares.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da OQX e CT nos níveis plasmáticos de T, massa relativa da próstata e vesícula seminal, massa corpórea inicial e final, ingestão de ração e água, massa relativa e concentração de PT das glândulas salivares de ratos Wistar.....	30
---	----

LISTA DE SIGLAS

AMI	Amilase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
AU	Ácido úrico
CAT	Catalase
CB1	Receptor canabinóide tipo 1
CT	Cipionato de Testosterona
DNPH	2,4-dinitrofenilidrazina
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	European Medicines Agency
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Capacidade antioxidante total
FS	Fluxo salivar
g	Grama
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
H&E	Hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IM	Intramuscular

IP	Intraperitoneal
kg	Kilograma
L	Litro
M3	Receptor muscarínico 3
mc	Massa corpórea
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
ng/dL	Nanograma por decilitro
OQX	Orquiectomia
PA	Parótida
PC	Proteína carbonilada
PT	Proteína total
SL	Sublingual
SM	Submandibular
SOD	Superóxido dismutase
T	Testosterona
TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
tc	Tecido conjuntivo
TCGs	Túbulos convolutos granulares
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
U	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.1.1	Objetivos específicos	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Animais e aspectos éticos	23
3.2	Delineamento experimental	23
3.3	Protocolo de orquiectomia	24
3.4	Fluxo salivar	24
3.5	Coleta e armazenamento de amostras de tecido e sangue	25
3.6	Parâmetros bioquímicos	25
3.6.1	Ensaio quimioluminescente de testosterona plasmática	26
3.6.2	Análise bioquímica salivar	26
3.7	Análise histomorfométrica	26
3.8	Análise bioquímica das glândulas salivares.....	27
3.8.1	Preparação do homogenato das glândulas salivares	27
3.8.2	Determinação do dano oxidativo lipídico	27
3.8.3	Defesa antioxidante não enzimática.....	27
3.8.4	Determinação da defesa antioxidante enzimática.....	28
3.9	Análise estatística.....	28
4	RESULTADOS.....	29
4.1	Níveis plasmáticos de T, massa relativa da próstata e vesícula seminal, massa corpórea, ingestão de ração e água, massa relativa e concentração de PT das glândulas salivares.....	29
4.2	Efeitos da OQX e CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares	30
4.3	Efeito da OQX e CT nos parâmetros bioquímicos salivares.....	32
4.4	Efeito da OQX e CT no dano oxidativo	34
4.5	Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante não enzimática.....	34
4.6	Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante enzimática.....	36

5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS.....	44
	ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A T, é um hormônio esteróide com atividade anabólica, produzido pelas células testiculares de Leydig e regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (SALERNO; CASCIO; BERTOZZI; SESSA *et al.*, 2018). A partir dos 40 anos de idade há um declínio de 1 a 2% ao ano na produção de T, porém, esse declínio pode ser acentuado em alguns casos, resultando em hipogonadismo clínico, também denominado de andropausa ou hipogonadismo de início tardio (HUHTANIEMI, I. T., 2014; REZAEI; AZADI; PAKZAD, 2018). Nesta condição, a diminuição dos níveis de T sérica é frequentemente marginal, e o hipogonadismo pode ser devido à insuficiência testicular primária (hipogonadismo primário) ou secundário devido a insuficiência hipotálamo-hipofisária (hipogonadismo secundário) (BHASIN; BRITO; CUNNINGHAM; HAYES *et al.*, 2018; HUHTANIEMI, I., 2014; SHIN; PARK, 2019; YEAP; WU, 2019).

A sintomatologia característica do hipogonadismo em homens engloba a disfunção erétil, diminuição da atividade sexual e perda de libido, diminuição da força muscular, diminuição da disposição, ondas de calor, ginecomastia, diminuição do volume testicular e fraturas de baixa energia (BAIN, 2010; DUDEK; KOZAKOWSKI; ZGLICZYNSKI, 2017).

Dentre os diversos fatores que influenciam a saúde bucal de homens, a variação dos níveis plasmáticos de testosterona (T) desponta como um fator de extrema importância, que até o momento foi pouco investigado. Em homens, a redução dos níveis plasmáticos de T está associada com a maior prevalência e agressividade da doença periodontal e da inflamação gengival (DALTABAN; SAYGUN; BOLU, 2006; FAMILI; CAULEY; GREENSPAN, 2007; STEFFENS; WANG; STARR; SPOLIDORIO *et al.*, 2015).

Embora a caracterização clínica seja bem estabelecida, os sinais e sintomas do hipogonadismo não são específicos e podem ser modificados pela idade, estresse, doenças pré-existentes, duração da deficiência androgênica e pela terapia prévia à base de T (BHASIN; BRITO; CUNNINGHAM; HAYES *et al.*, 2018; TAYLOR; PADILLA; HERNANDEZ, 2017). Baixos níveis de T são fortemente correlacionados com distúrbios médicos, como baixa libido, disfunção sexual, perda de força muscular, fadiga e alterações cognitivas e de humor (BAIN, 2010). A diminuição dos níveis de T também está associada ao aumento de biomarcadores sistêmicos da inflamação (BOBJER; KATRINAKI; TSATSANIS; LUNDBERG GIWERCMAN *et al.*, 2013), doença cardiovascular (HAK; WITTEMAN; DE JONG; GEERLINGS *et al.*, 2002), maior

percentual de mortalidade (LAUGHLIN; BARRETT-CONNOR; BERGSTROM, 2008), diabetes mellitus (STELLATO; FELDMAN; HAMDY; HORTON *et al.*, 2000), síndrome metabólica (LAAKSONEN; NISKANEN; PUNNONEN; NYSSONEN *et al.*, 2004) e risco de fratura óssea (MELLSTROM; JOHNELL; LJUNGGREN; ERIKSSON *et al.*, 2006). Estudo realizado com militares brasileiros com média de idade de 57 anos (24 à 87 anos de idade) confirmou que há uma redução progressiva dos níveis séricos de T em função do aumento da idade em homens brasileiros saudáveis, apresentando uma prevalência de 19,8% de hipogonadismo entre os participantes (NARDOZZA JUNIOR; SZELBRACIKOWSKI SDOS; NARDI; ALMEIDA, 2011).

Diante disto, a terapia de reposição hormonal (TRH) com T é recomendada com o objetivo primário de se atingir níveis plasmáticos de T dentro de um intervalo considerado fisiológico para reverter ou amenizar a sintomatologia de pacientes com hipogonadismo (MIRONE; DEBRUYNE; DOHLE; SALONIA *et al.*, 2017; NIESCHLAG, 2006). Os efeitos da TRH de andrógenos são bem evidenciados pelo aumento da densidade óssea, aumento da massa magra, eritropoiese, melhora da libido, e também tem demonstrado ter efeitos significativos nas propriedades anatômicas e fisiológicas do tecido erétil (NIESCHLAG, 2006; SNYDER; BHASIN; CUNNINGHAM; MATSUMOTO *et al.*, 2016). Entretanto, é necessário uma avaliação prévia sobre qual o medicamento a ser utilizado e melhor meio de aplicação, pois injeções intramusculares (IM) de ésteres de T de ação curta podem produzir picos suprafisiológicos e redução dos níveis de T endógena (BI; PERRY; ELLERBY; MURRY, 2018; NIESCHLAG, 2006).

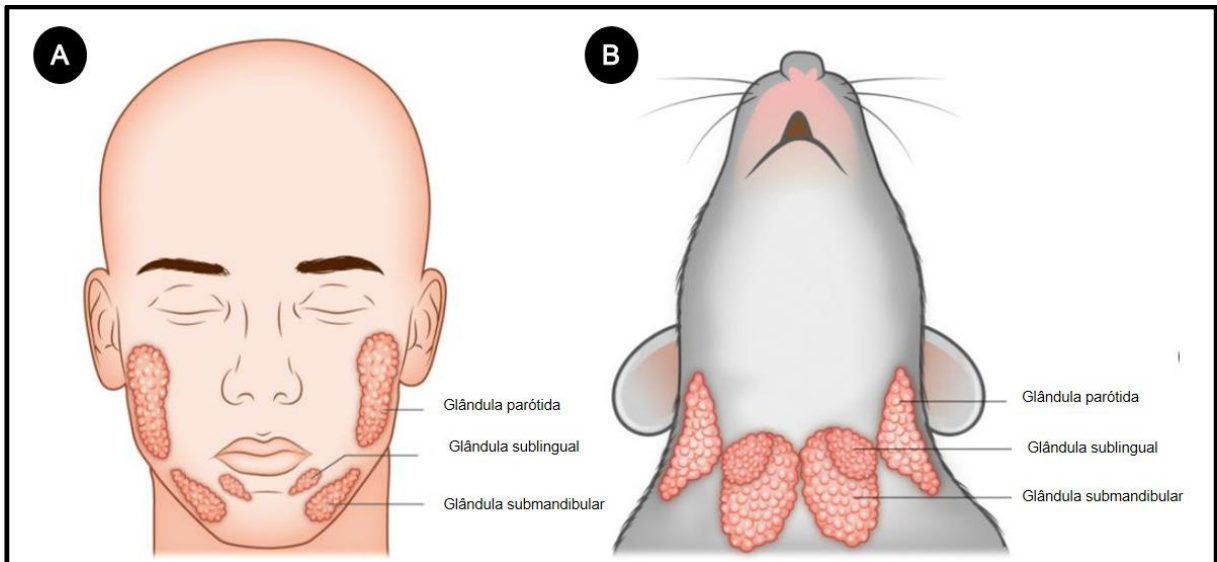
No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) autoriza a comercialização de medicamentos à base de T indicados para o tratamento do hipogonadismo primário e secundário (ANVISA., 2017). Existem várias formulações, as quais são escolhidas de acordo com a necessidade do paciente e custo do tratamento. Entre várias opções destaca-se o éster de T injetável, cipionato de testosterona (CT). O CT é frequentemente usado por via IM em veículo oleoso, e apresenta propriedade farmacodinâmica de liberação rápida de T, o que leva a um menor tempo entre os intervalos de aplicações. Deposteron® (CT, EMS Sigma Pharma LTDA, Brasil) é uma das formulações de T disponíveis no mercado brasileiro, e demonstra ser eficiente em aumentar o níveis de T e melhorar clinicamente pacientes hipogonádicos tardio (andropausa) (HOHL; MARQUES; CORAL; WALZ, 2009).

A orquiectomia (OQX) apresenta-se como modelo animal puro e exclusivo de hipogonadismo primário (SAKR; HUSSEIN; EID; ALKHATEEB, 2018). Em roedores, níveis suprafisiológicos de T e principalmente subfisiológicas, podem influenciar na densidade óssea mandibular (ARMADA; DE CASTRO BRASIL; ARMADA-DIAS;

BEZERRA *et al.*, 2018), no movimento ortodôntico (KARAKIDA; ARAUJO; JOHANN; CAMARGO *et al.*, 2017), na reabsorção óssea inflamatória no modelo experimental de doença periodontal (DE PAIVA GONCALVES; ORTEGA; STEFFENS; SPOLIDORIO *et al.*, 2018) e no reparo ósseo alveolar após a extração dentária (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA PUTTINI; SILVA GOMES-FERREIRA; PALIN *et al.*, 2019). Diversos estudos se limitam a contextualizar a influência da T no metabolismo ósseo do periodonto, negligenciando a importância das glândulas salivares e da saliva na homeostase bucal.

Mudanças na composição bioquímica da saliva são associadas com a predisposição da doença periodontal, cárie e estomatites (BENCHARIT; ALTARAWNEH; BAXTER; CARLSON *et al.*, 2012; RUHL, 2012; TARTAGLIA; GAGLIANO; ZARBIN; TOLOMEO *et al.*, 2017). A saliva contém uma mistura complexa de eletrólitos e proteínas com diferentes funções biológicas na digestão, atividades antimicrobianas, sensação gustatória, proteção, lubrificação e manutenção da saúde bucal e geral (ILEA; ANDREI; FEURDEAN; BAPTAN *et al.*, 2019). As glândulas salivares maiores, parótida (PA), submandibular (SM) e sublingual, são responsáveis pela produção de cerca de 90% da saliva não-estimulada (KONDO; NAKAMOTO; JARAMILLO; CHOI *et al.*, 2015). Estas glândulas apresentam uma estrutura anatômica semelhante entre humanos e roedores, consistindo em ácinos e ductos (Figura 2.A e B). Dependendo da glândula salivar, os ácinos são revestidos por combinações variáveis de células epiteliais mucosas e serosas, rodeadas por células mioepiteliais, localizadas entre a membrana plasmática basal e a membrana basal acinar (AMANO; MIZOBE; BANDO; SAKIYAMA, 2012). As secreções das células mucosas ficam contidas nos grânulos apicais, e quando secretadas, contribuem para a viscosidade da saliva. Em contraste, as secreções de células serosas incluem água, amilase (AMI), íons e proteínas (KONDO; NAKAMOTO; JARAMILLO; CHOI *et al.*, 2015). Após o estímulo contrátil, as células mioepiteliais forçam as secreções para o sistema ductal. Em roedores, os três principais ácinos das glândulas salivares drenam para os ductos intercalados intralobulares, que se conectam aos ductos estriados. Vários ductos estriados drenam para um ducto interlobular. Desta forma, as secreções são então drenadas para a excreção interlobular (RENEE R. HUKKANEN, 2018).

Figura 1. Imagem ilustrativa da posição anatômica das glândulas salivares em humanos (A) e roedores (B)

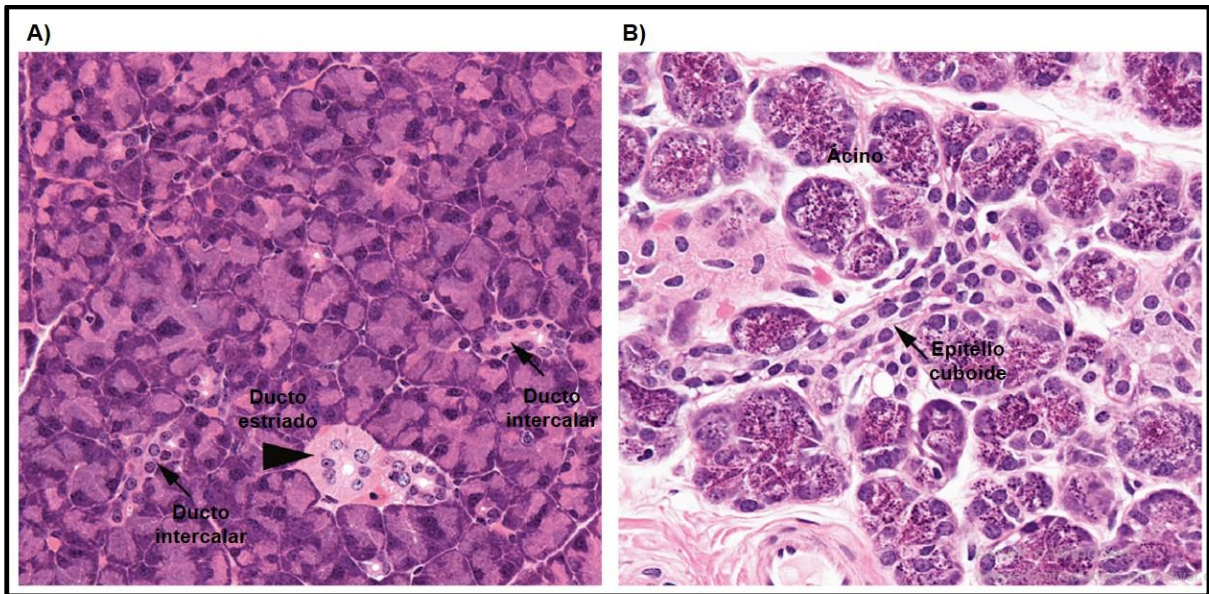


Fonte: (MARUYAMA; MONROE; HUNT; BUCHMANN *et al.*, 2019)

Tanto a glândula PA humana quanto a dos roedores são compostas de ácinos serosos (Figura 1. A e B). O ácino é composto por células serosas secretoras que contêm muitos grânulos com perfil elétron-lucente e estão situadas no citoplasma supranuclear. Essas células têm um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido na região infranuclear e são circundadas por células mioepiteliais (Figura 2. A e B) (AMANO; MIZOBE; BANDO; SAKIYAMA, 2012).

Os ácinos das glândulas SM em roedores são formados por células serosas e mucosas (Figura 3. A e B). As células acinares piramidais altas são basofílicas com núcleos basais e podem conter gotículas de mucina citoplasmática apical. Em roedores, o sistema ductal das glândulas SM é morfologicamente único, contendo túbulos convolutos granulares (TCGs) revestidos por epitélio colunar alto, conectando os ductos intercalados relativamente curtos com os ductos estriados (AMANO; MIZOBE; BANDO; SAKIYAMA, 2012). Os TCGs são sexualmente dimórficos em roedores, com ductos masculinos caracterizados por um diâmetro maior do que ductos femininos. Com o envelhecimento, esses ductos ocupam uma porcentagem maior da glândula de roedores machos, contendo grânulos secretores proeminentes de cor rosa brilhante (RENEE R. HUKKANEN, 2018). Este dimorfismo sexual é dependente de hormônios, pois as células epiteliais são sensíveis à T. Em ratos mais velhos de ambos os sexos, o sistema ductal da glândula SM contém oncócitos ocasionais, que são caracterizados por citoplasma eosinofílico granular contendo mitocôndrias abundantes (Figura 3. A e B) (AMANO; MIZOBE; BANDO; SAKIYAMA, 2012; RENEE R. HUKKANEN, 2018).

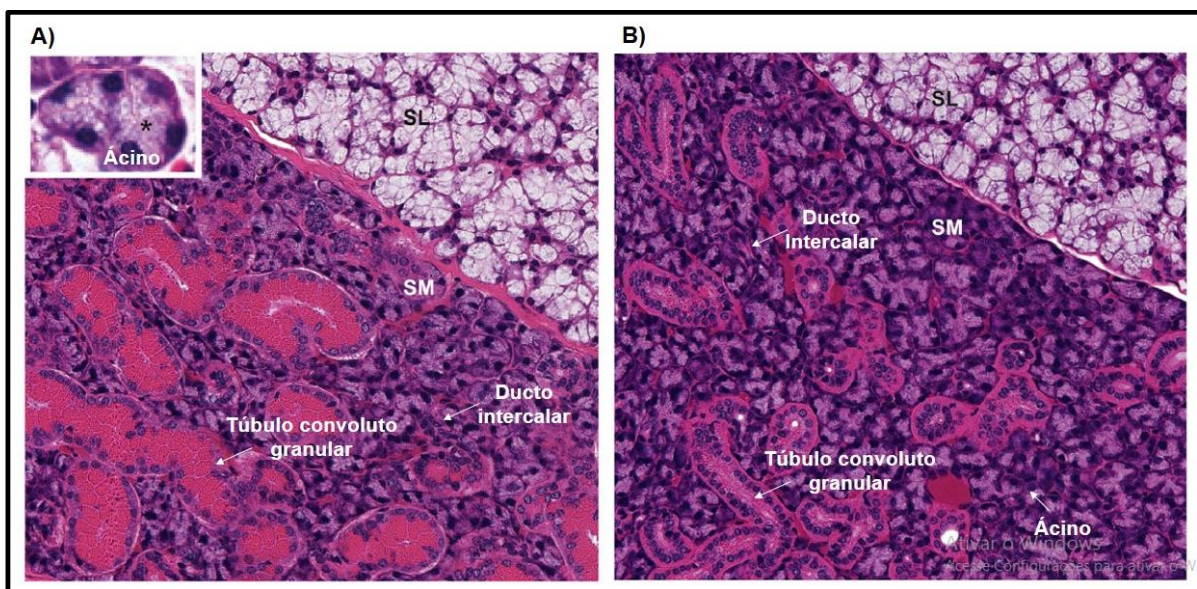
Figura 2. Cortes histológicos da glândula PA de camundongo (A) e humano (B)



Fonte: (RENEE R. HUKKANEN, 2018)

Cortes histológicos da glândula PA de camundongo (A) e humano (B), coradas com hematoxilina e eosina. (Figura A): Os ductos intercalados da glândula PA (setas) são revestidos por epitélio cubóide, em contraste com o ducto estriado (ponta de seta), revestido por epitélio colunar. Os ácidos da glândula PA em roedores são serosos com grânulos zimogênicos citoplasmáticos apicais que se coram de rosa. No corte histológico da glândula PA humana (Figura B), cada ducto intercalado (seta) é revestido por epitélio cubóide e deságua em um ducto estriado maior. Os ácidos da glândula PA são predominantemente serosos e contêm grânulos citoplasmáticos abundantes.

Figura 3. Corte histológico da glândula SM de camundongos macho (A) e fêmea (B)



Fonte: (RENEE R. HUKKANEN, 2018)

Cortes histológicos das glândulas SM de camundongos macho (A) e fêmea (B), coradas com hematoxilina e eosina. (Figura A): as células dos TCGs na glândula SM são maiores, com citoplasma granular rosa mais proeminente que nas fêmeas. (Figura B): Observe a presença da glândula sublingual (SL). A imagem mostra o maior número de ácidos na glândula SM de fêmeas com núcleos localizados na base e mucina apical. A glândula SL é indicada.

Por sua vez, as glândulas salivares capturam ativamente, metabolizam e secretam andrógenos na saliva, cujos os níveis refletem a concentração de T circulante livre no soro (LOOD; AARDAL-ERIKSSON; WEBE; AHLNER *et al.*, 2018). Embora seja bem

constatado que a produção, secreção e a composição bioquímica da saliva são alteradas por condições fisiológicas e patológicas, locais ou sistêmicas (NUNES; MUSSAVIRA; BINDHU, 2015; PEDERSEN; SORENSEN; PROCTOR; CARPENTER *et al.*, 2018), ainda não está claro os possíveis efeitos da OQX e TRH no fluxo, pH, capacidade tamponante e na composição bioquímica da saliva, apesar de evidências demonstrarem que a deficiência de T alteram as estruturas acinares e ductais das glândulas salivares.

A OQX reduz significativamente a expressão de receptores de androgênio (RA) nas glândulas salivares (LI; YAO; LIANG; WANG *et al.*, 2005). Nas glândulas SM de roedores, a OQX causa extensa involução das células dos TCGs devido à conversão do fenótipo em células do ducto estriado (ADTHAPANYAWANICH; KUMCHANTUEK; NAKATA; YAMAMOTO *et al.*, 2015). Essas alterações morfológicas envolvem alterações na expressão de proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição, fatores de crescimento, receptores de proteína tirosina fosfatase e proteases (ADTHAPANYAWANICH; KUMCHANTUEK; NAKATA; YAMAMOTO *et al.*, 2015; ONO MINAGI; SARPER; KUROSACA; KUREMOTO *et al.*, 2017; YAMAMOTO; NAKATA; KUMCHANTUEK; ADHAPANYAWANICH *et al.*, 2018). Estudos *ex vivo* também mostraram que OQX altera a regulação autonômica da glândula PA, reduzindo a liberação de AMI enquanto que a TRH foi capaz de restaurar a liberação de AMI (BUSCH; BORDA, 2003a; BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2002).

As glândulas salivares possuem um sistema de defesa antioxidante abrangente, que inclui componentes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational peroxidase (GPx) e a tiorredoxina redutase, e não enzimáticos, como as vitaminas A, C e E, além de carotenóides, lipídios, glutational (GSH), ácido úrico (AU), albumina, entre outros (HALLIWELL, 2007). O desequilíbrio desse sistema de defesa antioxidante nas glândulas salivares de roedores frente a diferentes tipos estressores está associado a disfunções das glândulas salivares, como visto após a exposição à radiação ionizante (CAKMAK KARAER; SIMSEK; YILDIZ; VARDI *et al.*, 2016), diabetes (ZUKOWSKI; MACIEJCZYK; MATCZUK; KUREK *et al.*, 2018) e periodontite experimentais (EKUNI; ENDO; IRIE; AZUMA *et al.*, 2010). Porém, pouco se sabe sobre o papel do T na modulação do estresse oxidativo nas glândulas salivares.

A OQX aumenta o dano oxidativo no cérebro (SON; LEE; KIM; KIM *et al.*, 2016) e em células endoteliais (KATAOKA; HOTTA; MAEDA; KIMURA, 2017). No entanto, na próstata, a exposição a altas doses de T reduz a atividade de SOD, CAT, GPx e a concentração da GSH, resultando em aumento da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), marcador clássico de dano oxidativo lipídico (JENA; VASISHT; SHARMA; KAUR *et al.*, 2016; KUMAR; YADAV; DATTA; SINGH *et al.*, 2011; SHOIEB; ESMAT; KHALIFA; ABDEL-NAIM, 2018; WU; GU; LI, 2017). Por

sua vez, o aumento das concentrações teciduais de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, um marcador de dano oxidativo ao ácido desoxirribonucleico na glândula SM e na próstata, após implante subcutâneo de T, sugere a existência de semelhanças entre esses tecidos com relação ao efeito da T, que vão além dos parâmetros morfológicos e fisiológicos (WHELAN; LU; FRIDMAN; WOLF *et al.*, 2010). Porém, na contramão do que é descrito para a próstata, ainda não foram caracterizados os efeitos da OQX e da TRH na defesa antioxidante enzimática e não-enzimática, bem como nos produtos de dano oxidativo das glândulas salivares.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar em ratos Wistar os efeitos da OQX e da TRH com CT no estresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares.

2.1.1 Objetivos específicos

Para responder a proposição e cumprir nosso objetivo geral, foram propostas as seguintes estratégias:

- Avaliar o efeito da OQX e TRH nos níveis plasmáticos de T, massa relativa da próstata e vesícula seminal, massa corpórea (mc), consumo alimentar e água, massa relativa glandular, bem como a concentração de proteína total (PT) no homogenato das glândulas PA e SM;
- Avaliar os aspectos histomorfométricos das glândulas PA e SM por meio da coloração de hematoxilina & eosina (H&E).
- Avaliar o fluxo salivar (FS), capacidade tamponante, pH, concentração de PT, atividade da AMI, bem como a concentração de cálcio, fosfato, cloreto e potássio na saliva, por meio da indução da salivação com pilocarpina em animais sob anestesia geral;
- Avaliar o dano oxidativo lipídico no homogenato das glândulas PA e SM, por meio da dosagem da concentração de proteína carbonilada (PC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs);
- Avaliar a defesa antioxidante não enzimática das glândulas PA e SM por meio das dosagens da capacidade antioxidante total não-enzimática, ácido úrico (AU) e glutathione (GSH) no homogenato;
- Avaliar a defesa antioxidante enzimática das glândulas PA e SM por meio das enzimas SOD, CAT e GPx no homogenato.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e aspectos éticos

O uso de animais e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, Brasil (Protocolo de Autorização nº 956-2018). Um total de quarenta e cinco ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*, 3 meses de idade) foram alojados em uma sala com controle de temperatura (22 ± 2 °C), umidade ($55\% \pm 10\%$) e (12/12h) ciclo claro/escuro) luminosidade (07h00-19h00) e alimentação padrão (Labina Purina, Paulínia, SP, Brasil). Os animais tiveram livre acesso a comida e água. A massa corpórea, ingestão de alimentos e água foram avaliadas duas vezes por semana.

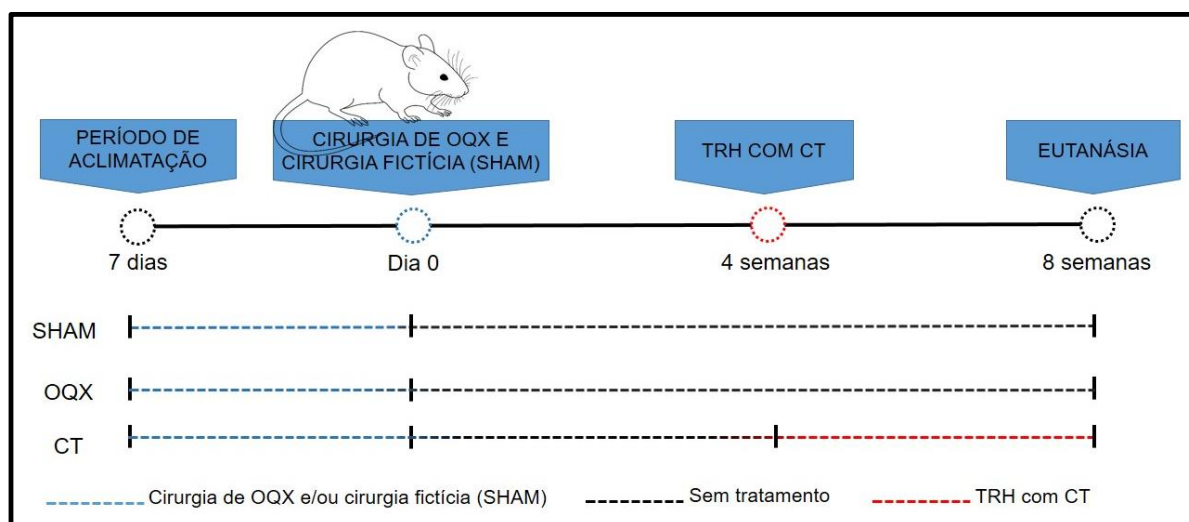
3.2 Delineamento experimental

O fluxograma esquemático do delineamento experimental do estudo pode ser observado na Figura 4. Após o período de aclimação (sete dias), os animais foram estratificados por massa corpórea (mc) e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em três grupos da seguinte forma (n = 15 ratos/grupo): **grupo SHAM**, os quais os testículos foram expostos (incisão da pele do escroto), mas não removidos e após 4 semanas receberam injeções intramusculares (IM) de solução salina/semanalmente por 4 semanas; **grupo OQX**, os ratos foram orquiectomizados e após 4 semanas receberam injeções IM de solução salina/semanalmente por 4 semanas (TEK; BALLI; CIMEN; EFESDY *et al.*, 2010); **grupo CT**, os ratos foram orquiectomizados e após 4 semanas receberam injeções IM de 10 mg/kg/semanalmente de cipionato de testosterona (CT, Deposteron®, EMS Sigma Pharma LTDA, Brasil) durante 4 semanas (UBELS; VEENSTRA; DITLEV; INGERSOLL, 2003). Dez animais foram destinados às análises bioquímicas e 5 animais tiveram suas glândulas salivares encaminhadas para processamento histológico e posterior análise histomorfométrica. De acordo com o cálculo do poder do teste, a inclusão de cinco animais seria suficiente para detectar uma diferença estatisticamente significativa de 30% na área de ductos (JEZEK; BANEK; BANEK, 1996) entre as amostras com um poder de 80% a um nível de significância de 5%. O tamanho amostral foi calculado usando o OpenEpi (http://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm).

A dose de CT e o regime de tratamento foi baseado em protocolos descritos na literatura. Quatro semanas após a orquiectomia é o tempo suficiente para reduzir as concentrações plasmáticas de T (BUSCH; BORDA, 2003a; DE PAIVA GONCALVES;

ORTEGA; STEFFENS; SPOLIDORIO *et al.*, 2018) e também para induzir alterações morfofisiológicas nas glândulas salivares em roedores conforme descrito previamente (CHEN; ZOU; ZHANG; XU *et al.*, 2016).

Figura 4. Fluxograma esquemático do estudo



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

3.3 Protocolo de orquiectomia

Para a cirurgia de OQX, todos os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) (75 e 10 mg/kg de mc, IM, respectivamente). A seguir foi realizada a antisepsia com iodeto de polivinilpirrolidona. Na sequência foi realizada incisão mediana anterior no escroto, abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Os funículos espermáticos foram apresentados, com concomitante individualização e laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular com fio de Nylon 5.0, e então seccionados. Os animais do grupo SHAM, foram submetidos à cirurgia fictícia, somente com exposição dos testículos e suturas, para compartilhar do mesmo estresse que os demais grupos. Todos os ratos receberam medicação analgésica (cetoprofeno 5 mg/kg mc, SC, Ketoflex, Mundo Animal, SP, Brasil) para alívio da dor no pós-operatório e combinação de benzilpenicilina e sais de estreptomicina (0,2 mL/kg mc, IM, Pentabiótico, Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). Após a cirurgia, os animais foram mantidos separados para recuperação durante 1 semana.

3.4 Coleta da saliva, fluxo salivar, pH e capacidade tamponante

Ao final do período de tratamento, os animais foram novamente anestesiados, conforme descrito anteriormente, e o FS foi estimulado com nitrato de pilocarpina (5 mg/kg de mc, IP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os animais foram colocados em uma prancha inclinada, e a saliva coletada em frascos previamente pesados e mantidos em gelo por 10 min, contados desde a primeira gota de saliva. O volume de saliva foi calculado pela diferença de peso entre o frasco cheio e vazio, considerando a densidade da saliva como 1 g/mL (ELIAS; DOS SANTOS; SASSAKI; DELBEM *et al.*, 2006). O FS foi calculado considerando a quantidade de saliva coletada por minuto e o peso do animal (quilograma). Foi expresso em mililitros de saliva por minuto por 100 g de mc. A saliva foi fracionada e armazenada (-80 °C) até o dia da análise laboratorial. O pH e a capacidade tamponante foram avaliados imediatamente após a coleta. O pH salivar foi medido em amostras de saliva com eletrodo específico (Analyzer, São Paulo, SP, Brasil) conectado a um pHmetro (Thermo Fischer, Orion 720A, MA, EUA), previamente calibrado. A capacidade tamponante foi calculada pelo método titulométrico, de acordo com o volume de ácido láctico (0,1 mol/L) utilizado para reduzir o pH salivar para 4,0 e foi expresso em mL de ácido láctico (PICCO; COSTA; DELBEM; SASSAKI *et al.*, 2012).

3.5 Coleta e armazenamento de amostras de tecido e sangue

Posteriormente, os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca, sempre pela manhã (9h às 11h) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano, as glândulas PA e SM esquerda e direita foram imediatamente retiradas, secas e pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C, até o momento da utilização. Amostras de sangue foram coletadas durante a punção cardíaca e o plasma foi obtido após centrifugação por 10 minutos a 4 °C e armazenado a -80 °C. A eficácia da OQX foi confirmada pela avaliação da massa da próstata e vesícula seminal ao final do experimento.

3.6 Parâmetros bioquímicos

Todos os reagentes para os ensaios bioquímicos foram obtidos na Sigma-Aldrich, Alemanha/EUA. A absorbância foi medida usando espectrofotômetro UV-Vis (U-2000, Hitachi, Japão) e espectrofotômetro leitor de microplacas (PowerWave 340, BioTek, EUA). Todas as determinações foram determinadas em duplicata e padronizadas pelo conteúdo de PT. A normalização pela PT possibilitou avaliar as diferenças na proporção de analitos bioquímicos presentes na saliva e homogenatos

de tecido.

3.6.1 Ensaio quimioluminescente de testosterona plasmática

Os níveis plasmáticos de T total foram medidos usando imunoensaio quimioluminescente de micropartículas com um analisador de imunologia Architect i1000 (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EUA) de acordo com as informações do fabricante. Os dados foram expressos em ng/dL.

3.6.2 Análise bioquímica salivar

A concentração de PT foi determinado usando o método de Hartree-Lowry (HARTREE, 1972), usando albumina de soro bovino como padrão. A atividade de AMI foi determinada pela reação de cor do amido-iodo conforme descrito anteriormente em detalhes (NAGY; BARTA; VARGA; ZELLES, 2001) utilizando kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). Uma unidade (U) de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 10 mg de amido em 30 minutos de reação nas condições do ensaio descrito.

Kits colorimétricos comerciais foram usados para quantificar cálcio, fósforo e cloreto (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as recomendações dos fabricantes para cada teste. O sódio e o potássio foram determinados por analisador de eletrólitos íon seletivo (9180, Electrolyte Analyzer, Roche®). Os valores de eletrólitos foram expressos em mmol/L.

3.7 Processamento histológico e análise histomorfométrica

As glândulas salivares, obtidas de 5 animais por grupo, foram fixadas em solução de formalina neutra tamponada 10%, pH 7,4 por 24 horas. Após a fixação, o material foi submetido ao processo de desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Para avaliação da morfologia das glândulas salivares, cortes de cinco micrômetros foram corados com H&E. Um histologista certificado, calibrado e cego para os tratamentos, realizou a análise histomorfométrica. As imagens foram capturadas por uma câmera digital (Olympus, XC50, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (Olympus, BX53, Tóquio, Japão) com aumento original de 400x. Foram obtidas seis fotomicrografias de dois cortes histológicos de cada glândula. A área total das glândulas salivares foi medida (μm^2) com o software Image J, (ImageJ, National Institutes of Health, USA, versão 1.50i) usando a ferramenta “free hands” para delimitar as áreas ocupadas por estruturas parenquimatosas (TCGs, ductos e ácinos). A área de tecido

conjuntivo foi considerada a área total da imagem menos a área do parênquima. A área total da imagem foi quantificada em 100% e após a média da área das 6 imagens, os valores resultantes foram submetidos a uma regra de três para calcular a porcentagem de cada estrutura analisada (BERTOLDO; ETCHEBEHERE; FURTADO; FARIA *et al.*, 2019; MONTEIRO; D'EPIRO; BERNARDI; FOSSATI *et al.*, 2017).

3.8 Análise bioquímica das glândulas salivares

3.8.1 Preparação do homogenato das glândulas salivares

No dia da análise bioquímica, as glândulas salivares foram descongeladas em gelo e lavadas em solução salina gelada (NaCl 0,9%, m/v). O homogeneizador Potter-Elvehjem (modelo MA 099; Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) foi usado para preparar os homogenatos das glândulas a 5% em tampão fosfato de sódio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) de Triton X-100, ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) 10 mmol/L e fluoreto de fenilmetanossulfonil 2 mmol/L (PMSF). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C usando uma centrífuga Eppendorf R 5810 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi coletado, aliquoteado e armazenado a 80 °C por menos de 2 semanas para posterior análise de PT, proteína carbonilada (PC), TBARs, capacidade antioxidante total (FRAP), ácido úrico (AU), SOD, CAT e GPx. Os sobrenadantes para serem usados para determinação da GSH foram preparados em 5% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) contendo 2 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentacético (EDTA), centrifugado a 4000 rpm por 10 min a 4 °C.

3.8.2 Determinação do dano oxidativo proteico e dano oxidativo lipídico

A concentração de PC foi quantificada usando o método alcalino 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA; OLIVEIRA; BENTO; GERALDO *et al.*, 2014). O conteúdo de carbonil foi calculado, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da concentração de TBARs (BUEGE; AUST, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.8.3 Defesa antioxidante não-enzimática

A capacidade antioxidante total foi determinada espectrofotometricamente por meio da FRAP, conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados foram calculados utilizando uma curva padrão com diferentes

concentrações de soluções de FeSO_4 . A concentração de GSH (GSH reduzida + GSSG oxidada) foi determinada espectrofotometricamente por um ensaio ligeiramente modificado, como descrito anteriormente (AKERBOOM; SIES, 1981). Os sobrenadantes ácidos foram adicionados a um meio contendo 100 mmol/L de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), 2 mmol/L de EDTA, 0,6 mmol/L 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), 0,2 mmol/L de NADPH e 0,5 kU/L de glutathiona redutase; a quantificação dos níveis foi baseada na curva padrão de GSH. A concentração de AU foi mensurada com um kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). A uricase foi usada no ensaio para transformar o AU em alantoína e peróxido de hidrogênio (TRIVEDI; REBAR; BERTA; STONG, 1978).

3.8.4 Determinação da defesa antioxidante enzimática

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) mensurando a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (240 nm) medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades da atividade da enzima foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de peróxido de hidrogênio por 1 minuto.

A atividade da GPx foi determinada pelo método que utiliza o peróxido de di-terc-butila como substrato da reação, ocorrendo oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathiona redutase (GR), consumindo nessa reação uma molécula de NADPH (WENDEL, 1981). A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o consumo de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida de sódio, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e amostras. A azida de sódio foi usada para bloquear a atividade da catalase. Uma U da atividade da GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.9 Análise estatística

Todos os dados foram analisados em duplicata, expressos como média $\pm$ padrão e analisados quanto ao desvio da normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov), e submetidos a análise estatística ANOVA seguida pelo teste de *Tukey*. Para todos os testes, foi fixado em 5% ($p < 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade, e todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Níveis plasmáticos de T, massa relativa da próstata e vesícula seminal, massa corpórea, ingestão de ração e água, massa relativa e concentração de PT das glândulas salivares

Os níveis plasmáticos de T reduziram significativamente após a OQX ($p < 0,001$), sendo indetectável por imunoensaio comparado ao grupo SHAM. As massas relativas da próstata e próstata associada à vesícula seminal foram substancialmente reduzidas comparando os grupos OQX *versus* SHAM ($p < 0,0001$). A TRH com CT aumentou os níveis plasmáticos de T ($p < 0,001$), bem como as massas relativas da próstata e próstata associada à vesícula seminal em comparação com grupos SHAM ($p < 0,001$) e OQX ($p < 0,0001$) (Tabela 1).

Ao final do experimento, o grupo OQX apresentou menor ganho de massa corpórea em comparação ao grupo SHAM ($p < 0,001$); por sua vez, no grupo CT houve aumento parcial da massa corpórea final comparado ao grupo OQX ($p < 0,01$) (Tabela 1). A ingestão de ração foi significativamente menor no grupo OQX em relação ao grupo SHAM ($p < 0,01$). A TRH com CT resultou no aumento parcial da ingestão de ração em comparação ao grupo OQX ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na ingestão de água entre os grupos, bem como não foi encontrada diferenças estatisticamente relevante na massa relativa da glândula PA entre os grupos. Não foram observadas diferenças na massa relativa da glândula SM entre o grupo OQX *versus* SHAM, no entanto, a TRH com CT aumentou a massa relativa da glândula SM em relação aos grupos SHAM ($p < 0,001$) e OQX ($p < 0,0001$) (Tabela 1). A concentração de PT no homogenato da glândula PA foi semelhante entre os grupos, enquanto este parâmetro foi significativamente menor na glândula SM do grupo OQX comparado ao grupo SHAM ($p < 0,01$). A TRH aumentou a concentração de PT, a qual retornou a valores semelhante ao grupo SHAM ($p < 0,0001$) (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis plasmáticos de T, massa relativa da próstata e vesícula seminal, massa corpórea, ingestão de ração e água, massa relativa e concentração de PT das glândulas salivares

Parâmetros	SHAM	OQX	CT
Níveis plasmáticos de testosterona (ng/dL)	346,9 ± 99,9	7,0 ± 0,0****	547,7 ± 92,58****#
Massa relativa da próstata (g/kg de mc)	2,69 ± 0,48	0,43 ± 0,15****	3,50 ± 0,56****###
Massa relativa da próstata + vesícula seminal (g/kg de mc)	6,4 ± 1,26	0,63 ± 0,19****	8,88 ± 1,03****###
Massa corpórea inicial (g)	482,0 ± 17,2	468,3 ± 21,2	473,0 ± 12,1
Massa corpórea final (g)	583,5 ± 31,1	516,6 ± 33,8****	560,6 ± 26,6##
Ingestão de ração (kg/semana/grupo)	729,3 ± 17,4	642,3 ± 34,0**	712,8 ± 60,7#
Ingestão de água (L/semana/grupo)	1,47 ± 0,17	1,38 ± 0,12	1,35 ± 0,10
Massa relativa PA (g/kg de mc)	0,717 ± 0,08	0,762 ± 0,10	0,763 ± 0,09
Massa relativa SM (g/kg de mc)	0,751 ± 0,05	0,719 ± 0,07	0,900 ± 0,09****###
Conteúdo de PT da PA (mg/g de tecido)	12,76 ± 0,66	12,72 ± 0,71	12,30 ± 0,97
Conteúdo de PT da SM (mg/g de tecido)	23,84 ± 2,68	19,89 ± 2,43**	25,19 ± 2,17####

Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

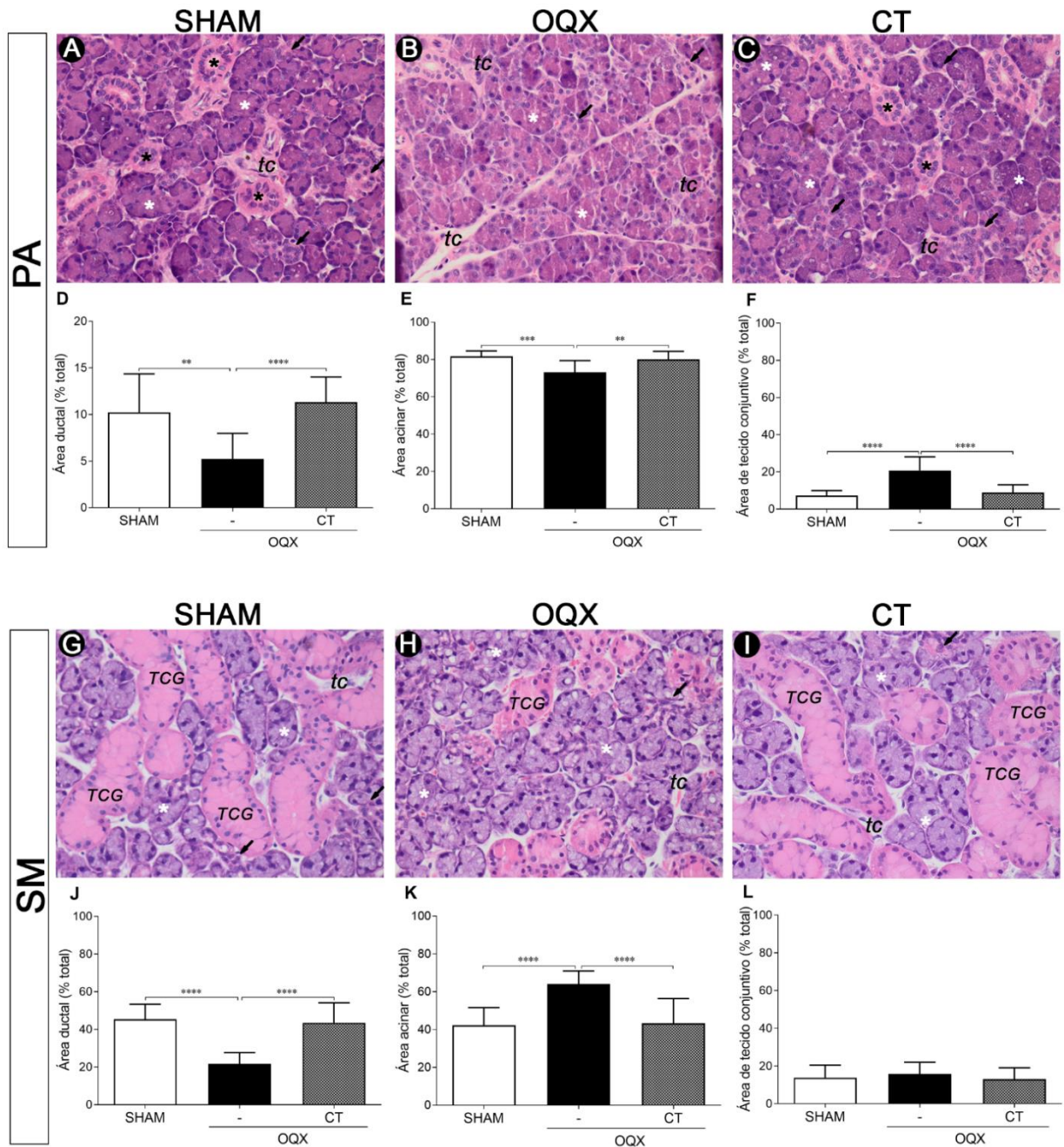
Os dados foram expressos como média ± desvio padrão, n = 10 ratos/grupo. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância ANOVA – one way seguido do teste de Tukey. Para todas as análises(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ versus grupo SHAM; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; #### $p < 0,0001$ versus OQX).

4.2 Efeito da OQX e CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares

A OQX reduziu a área de ductos da glândula PA ($p < 0,01$) (Figura 5D), bem como a área acinar ($p < 0,001$) (Figura 5E) em relação ao grupo SHAM. Contudo, a OQX aumentou significativamente a área de tecido conjuntivo na glândula PA em comparação com o grupo SHAM ($p < 0,0001$) (Figura 5F). Por sua vez, a TRH com CT aumentou a área ductal em relação ao grupo OQX ($p < 0,0001$) (Figura 5D), reduziu a área acinar em relação ao grupo OQX ($p < 0,01$) (Figura 5E), além de reduzir a área de tecido conjuntivo comparado ao grupo OQX ($p < 0,001$) na glândula PA (Figura 5F), retornando a ser semelhante ao grupo SHAM. Em relação a glândula SM, a OQX reduziu a área de ductos comparado ao grupo SHAM ($p < 0,001$) (Figura 5J), mas

aumentou significativamente a área acinar em relação ao grupo SHAM ($p < 0,01$) (Figura 5K). A TRH com CT restabeleceu a área de ductos comparado ao grupo OQX ($p < 0,001$) (Figura 5J), e reduziu a área acinar em relação ao grupo OQX ($p < 0,001$) (Figura 5K), sendo estatisticamente igual ao grupo SHAM. Não foram observadas diferenças entre os grupos na área de tecido conjuntivo na glândula SM (Figura 5L).

Figura 5. Efeito da OQX e CT nos parâmetros histomorfométricos das glândulas salivares



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

Fotomicrografias da glândula PA (A, B e C) e glândula SM (G, H e I) e análises histomorfométricas da área ductal (D e J), área acinar (E e K) e tecido conjuntivo (F e L). Para avaliação da morfologia das glândulas salivares, os cortes foram corados com H&E e a quantificação da área das estruturas foi calculada pela área total da glândula. Ampliação original de 400x e barra de escala de 20 μ m. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 5$ ratos/grupo. Quatro semanas após a OQX, a TRH com CT foi iniciada via IM, semanalmente, com 10 mg/kg de mc de CT durante quatro semanas até a

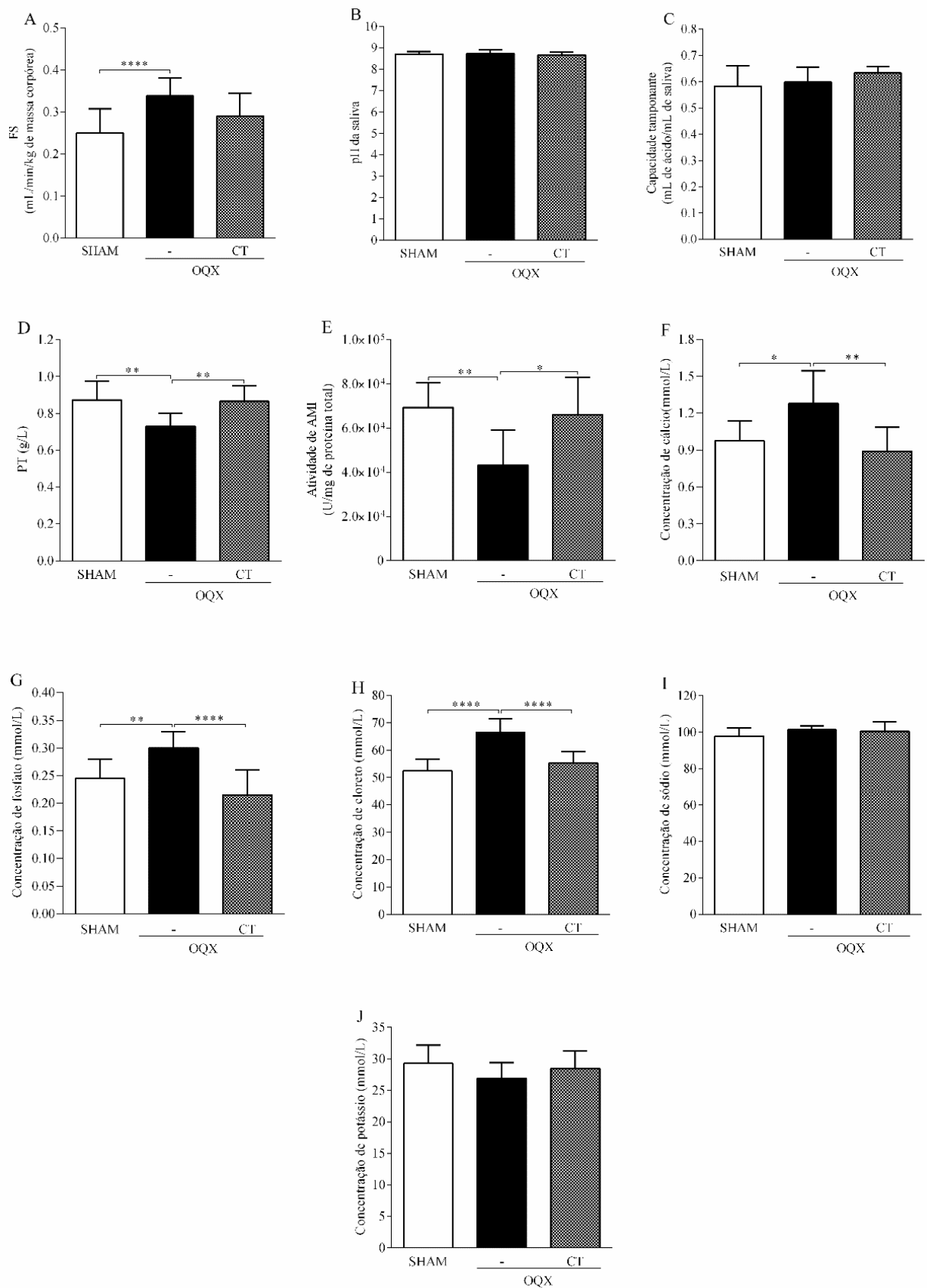
eutanásia. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA – *One Way*) seguida do teste post hoc de *Tukey*. Para todas as análises (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.3 Efeitos da OQX e CT nos parâmetros bioquímicos salivares

No presente estudo, o FS foi significativamente maior no grupo OQX em comparação ao grupo SHAM ($p < 0,0001$). A TRH restaurou parcialmente este parâmetro (Figura 6A). Neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao pH e capacidade tamponante da saliva entre os grupos (Figura 6B e C).

A concentração de PT diminuiu significativamente no grupo OQX em relação ao grupo SHAM ($p < 0,001$), a qual foi restaurada no grupo CT (Figura 6D). A atividade de AMI foi reduzida no grupo OQX em comparação com o grupo SHAM ($p < 0,001$), enquanto que no grupo CT esse efeito retornou a níveis próximos ao do grupo SHAM ($p < 0,0001$) (Figura 6E). Houve aumento nas concentrações de cálcio (Figura 6F; $p < 0,05$), fosfato (Figura 6G; $p < 0,01$) e cloreto (Figura 6H, $p < 0,0001$) no grupo OQX *versus* grupo SHAM, sendo estes restabelecidos após a TRH com CT. Não foram observadas diferenças na concentração de sódio e potássio salivar entre os grupos (Figura 6I e 6J).

Figura 6. Efeito da OQX e CT no fluxo salivar e parâmetros bioquímicos salivares



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

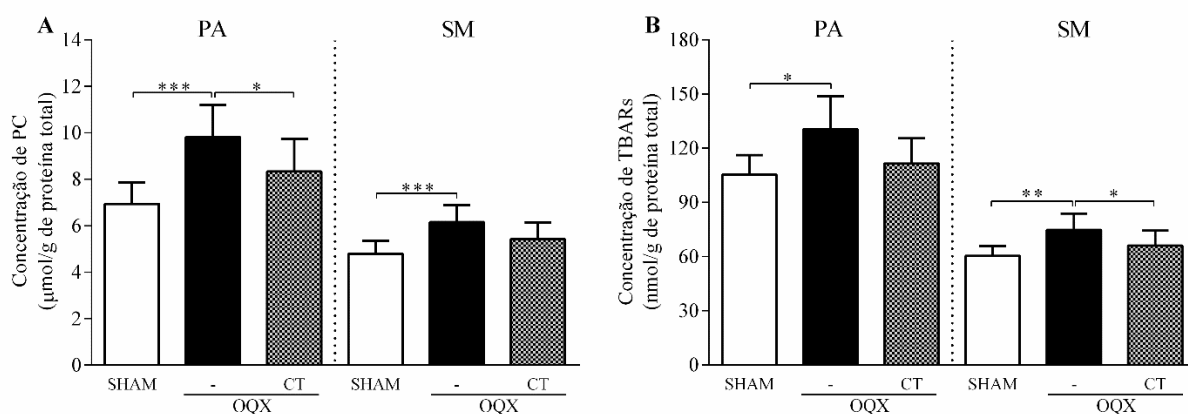
Determinação do FS (A), pH (B), capacidade tamponante (C), PT (D), atividade de AMI (E), concentração de cálcio (F), fosfato (G), cloreto (H), sódio (I) e potássio (J) na saliva de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$ ratos/grupo. Quatro semanas após a OQX,

a TRH com CT foi iniciada via IM, semanalmente, com 10 mg/kg de mc de CT durante quatro semanas até a eutanásia. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA - *One Way*) seguida do teste post hoc de *Tukey*. Para todas as análises (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.4 Efeito da OQX e CT no dano oxidativo proteico e lipídico

A OQX aumentou a concentração de PC na glândula PA comparado ao grupo SHAM ($p < 0,001$), enquanto no grupo CT houve redução parcial da concentração de PC em relação ao grupo OQX ($p < 0,05$). Da mesma forma, na glândula SM, houve aumento da concentração de PC no grupo OQX comparado ao grupo SHAM ($p < 0,001$); no entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos OQX e CT (Figura 7A). Houve aumento significativo na concentração de TBARs no grupo OQX em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$) na glândula PA. Embora o CT tenha diminuído a concentração de TBARs em relação ao grupo OQX, a diferença não foi estatisticamente significativa. Da mesma forma, a concentração de TBARs foi significativamente maior no grupo OQX comparado ao grupo SHAM ($p < 0,01$) na glândula SM, a qual foi parcialmente reduzida no grupo CT ($p < 0,05$) (Figura 7B).

Figura 7. Efeito da OQX e CT no dano oxidativo proteico e lipídico nas glândulas salivares de ratos Wistar



Fonte: Elaborado pelo Autor (2020)

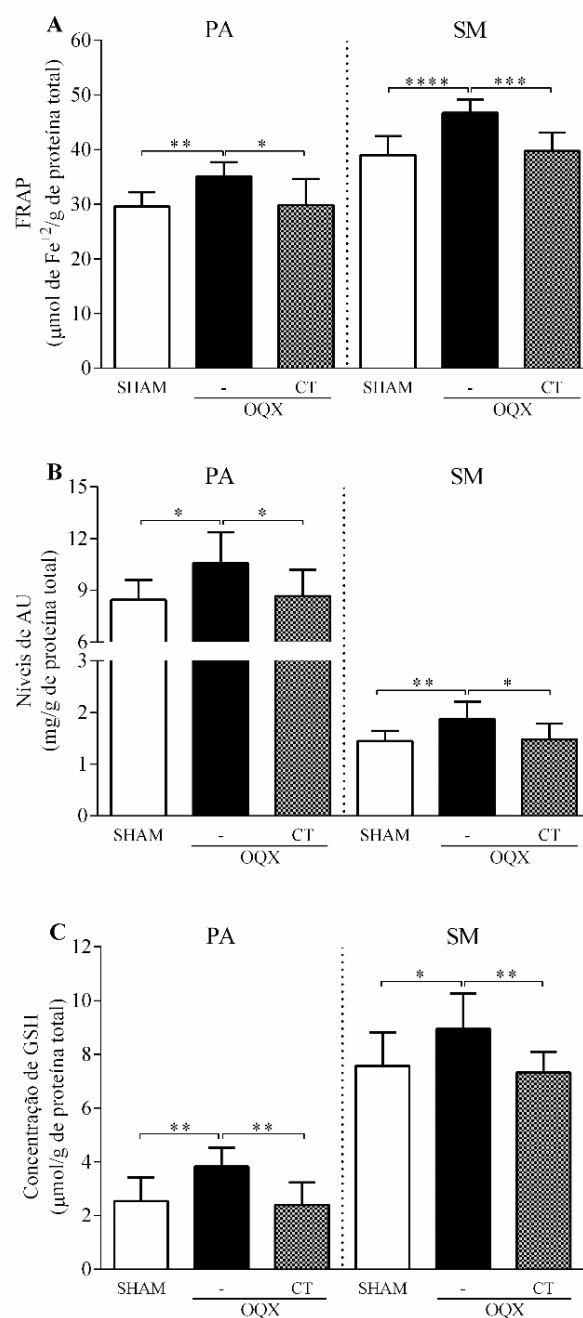
Determinação da concentração de PC (A) e TBARs (B) nas glândulas salivares de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$ ratos/grupo. Quatro semanas após a OQX, a TRH com CT foi iniciada via IM, semanalmente, com 10 mg/kg de mc de CT durante quatro semanas até a eutanásia. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA – *One Way*) seguida do teste post hoc de *Tukey*. Para todas as análises (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

4.5 Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante não - enzimática

A OQX aumentou a FRAP em ambas as glândulas salivares em comparação ao grupo SHAM (PA, $p < 0,01$; SM, $p < 0,0001$), enquanto que a FRAP retornou para

valores próximos ao do grupo SHAM após a TRH com CT (Figura 8A). A OQX também aumentou a concentração de AU em ambas as glândulas salivares em relação ao grupo SHAM (PA, $p < 0,05$; SM, $p < 0,01$), enquanto que a concentração de AU retornou aos valores semelhante ao do grupo SHAM após a TRH (Figura 8B). Da mesma forma, as concentrações de GSH na glândula PA e SM foram significativamente maiores no grupo OQX em comparação ao grupo SHAM ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). De modo semelhante, a TRH foi eficiente em reduzir as concentrações próximas ao do grupo SHAM ($p < 0,01$) (Figura 8C).

Figura 8. Efeito da OQX e CT na capacidade antioxidante não - enzimática

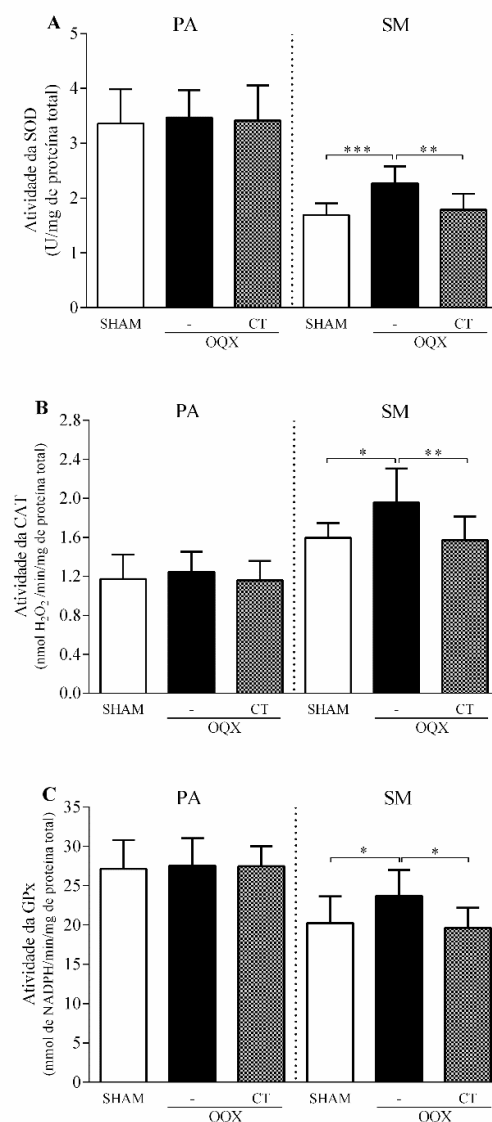


Determinação da concentração de FRAP (A), AU (B) e GSH (C) nas glândulas salivares de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$ ratos/grupo. Quatro semanas após a OQX, a TRH com CT foi iniciada via IM, semanalmente, com 10 mg/kg de mc de CT durante quatro semanas até a eutanásia. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA - One Way) seguida do teste post hoc de Tukey. Para todas as análises ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$).

4.6 Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante enzimática

Não foram observadas diferenças entre os grupos nas atividades da SOD, CAT e GPx na glândula PA (Figura 9). No entanto, a OQX aumentou a atividade das enzimas antioxidantes na glândula SM em comparação ao grupo SHAM (SOD, $p < 0,001$; CAT, $p < 0,05$; GPx, $p < 0,05$), enquanto que a atividade de todas as enzimas antioxidantes retornaram a valores semelhantes ao do grupo SHAM após a TRH com CT (Figura 9. A, B e C).

Figura 9. Efeito da OQX e CT na defesa antioxidante enzimática



Determinação da atividade da SOD (A), atividade da CAT (B) e atividade da GPx (C) nas glândulas salivares de ratos Wistar. Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, $n = 10$ ratos/grupo. Quatro semanas após a OQX, a TRH com CT foi iniciada via IM, semanalmente, com 10 mg/kg de mc de CT durante quatro semanas até a eutanásia. Os resultados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA – *One Way*) seguida do teste post hoc de *Tukey*. Para todas as análises (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos OQX e TRH sobre o estresse oxidativo e função secretora das glândulas salivares induzidas pela pilocarpina. Após oito semanas, a OQX promoveu aumento do FS, além de reduzir a secreção de PT e AML, e aumentar a secreção dos eletrólitos cálcio, fosfato e cloreto. Por sua vez, a TRH com CT administrada por quatro semanas foi eficiente para restaurar o FS, a secreção de PT e a atividade de AML, bem como reduzir a secreção dos eletrólitos cálcio, fosfato e cloreto. A OQX aumentou o dano oxidativo, a defesa antioxidantes não - enzimática e enzimática nas glândulas salivares, enquanto que a TRH restabeleceu todos parâmetros a níveis semelhantes ao grupo SHAM.

O protocolo terapêutico utilizando 10 mg/kg de mc de CT, IM, semanalmente, foi baseado em protocolos com o intuito de obter níveis fisiológicos de T ao final do tratamento (GAUTHAMAN; GANESAN, 2008; UBELS; VEENSTRA; DITLEV; INGERSOLL, 2003). O CT apresenta a característica farmacocinética de liberação rápida da T, levando a um menor tempo entre os intervalos de aplicações. O CT é frequentemente aplicado via IM em um veículo oleoso (álcool benzílico, benzoato de benzila e óleo de amendoim) e tem um custo relativamente baixo (UBELS; VEENSTRA; DITLEV; INGERSOLL, 2003), além disso, o CT é aprovado para comercialização no Estados Unidos pela *Food and Drug Administration* (EUA-FDA) e pela *European Medicines Agency* (EMA). O início da TRH após 4 semanas da OQX justifica-se pelo fato desse período ser o suficiente para reduzir significativamente os níveis plasmáticos de T e diminuir a massa relativa da próstata e vesícula seminal (BUSCH; BORDA, 2003b; CONTINI; MILLEN; GONZÁLEZ; BENMELEJ *et al.*, 2016). Os resultados demonstraram níveis suprafisiológicos de T, acompanhado pelo aumento da massa relativa da próstata e vesícula seminal no grupo CT. Essa discrepância provavelmente ocorreu porque os autores realizaram apenas uma aplicação do CT (UBELS; VEENSTRA; DITLEV; INGERSOLL, 2003), enquanto que este estudo realizou quatro aplicações, o que denota um efeito acumulativo da T. Apesar dos níveis suprafisiológicos de T, o protocolo terapêutico foi eficiente em evidenciar a relação entre os parâmetros bioquímicos e histomorfométricos das glândulas salivares e a T. Tendo-se em vista essas considerações, essa pesquisa abre novas perspectivas de

estudos visando analisar os efeitos de outras formulações, cuja farmacocinética e protocolo terapêutico divergem do CT.

Em animais OQX, a redução da massa corpórea final pode estar associada a uma diminuição na ingestão alimentar (WALLEN; BELANGER; WITTNICH, 2002) e atrofia muscular (AXELL; MACLEAN; PLANT; HARCOURT *et al.*, 2006). Por sua vez, o protocolo de TRH com CT aumentou a massa corpórea final e a ingestão alimentar, de forma semelhante a estudos que utilizaram implantes de T (AXELL; MACLEAN; PLANT; HARCOURT *et al.*, 2006; NIKOLAENKO; JIA; WANG; DIAZ-ARJONILLA *et al.*, 2014).

A razão da OQX e CT não alterarem a massa relativa da glândula PA em relação ao grupo SHAM pode ser associada com o aumento do parênquima em relação ao tecido conjuntivo, causando a estabilização da massa da glândula PA (JEZEK; BANEK; BANEK, 1996). Por sua vez, a massa relativa da glândula SM permaneceu inalterada após a OQX, contradizendo a literatura, a qual demonstra que a OQX reduz a massa da glândula SM em ratos (SAWADA; NOUMURA, 1991). Essa diferença pode estar associada à linhagem e idade de castração do animal, bem como à diferenças na forma de apresentação dos resultados da massa das glândulas SM, uma vez que optamos por realizar a normalização em função da massa corpórea (MELVIN; HAMILL, 1987; SAWADA; NOUMURA, 1991). Por outro lado, o aumento da massa relativa da glândula SM no grupo CT em relação ao grupo SHAM e OQX, pode ser justificado pela concentração plasmática suprafisiológica de T, uma vez que há relatos da estreita relação entre a glândula SM e a próstata em relação à resposta aos andrógenos (WHELAN; LU; FRIDMAN; WOLF *et al.*, 2010).

A análise da concentração de PT no homogenato tecidual é considerada uma referência para a função anabólica das glândulas salivares (ZALEWSKA; KNAŚ; MACIEJCZYK; WASZKIEWICZ *et al.*, 2015). Apesar do efeito anabólico da T em vários tecidos, o conteúdo de PT foi inferior apenas nas glândulas SM do grupo OQX, enquanto esse parâmetro permaneceu semelhante ao grupo SHAM na glândula PA. Resultados semelhantes foram encontrados nas glândulas PA (BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2006a) e SM (MINETTI; VALLE; OLIVEIRA-FILHO; FAVA-DE-MORAES, 1985) de roedores após a castração. Os resultados do conteúdo de PT no grupo CT demonstram que apenas a glândula SM tem sua função anabólica modulada pela T, uma vez que nessa glândula a TRH aumentou a concentração de PT, enquanto que nas glândulas PA do grupo CT esse parâmetro permaneceu semelhante ao grupo SHAM.

O protocolo experimental adotado confirmou as alterações histológicas nas

glândulas PA e SM que ocorrem após a OQX. Esses resultados estão associados à atrofia das partes funcionais das glândulas e ao aumento do tecido conjuntivo na glândula PA, indicando que a OQX causa uma inversão da atividade celular e sinalização prejudicada (JEZEK; BANEK; BANEK, 1996). Na glândula SM, a involução do sistema de ductos e aumento da área acinar, foi semelhante ao observado em estudo com animais OQX (HULLY; BENTON; ALISON, 1984). A TRH com CT foi eficiente no restabelecimento da morfologia glândular, semelhante a estudos utilizando os ésteres enantato de T (JEZEK; BANEK; BANEK, 1996) e propionato de T (CHRÉTIEN, 1977); A TRH restaurou os TCG em ratos OQX (RINS DE DAVID; FINKELBERG DE STERIN; GOLDRAIJ, 1991; SAWADA; NOUMURA, 1991), o nível dos fatores tróficos (THOENEN; ANGELETTI; LEVI-MONTALCINI; KETTLER, 1971), bem como estimulou a síntese protéica e hipertrofia das glândulas SM de camundongos (MINETTI; VALLE; OLIVEIRA-FILHO; FAVA-DE-MORAES, 1985). A OQX aumentou o FS, porém não alterou a capacidade tamponante e o pH salivar. Além disso, a OQX reduziu a concentração de PT e a atividade de AMI, e aumentou o cálcio e o fosfato na saliva em relação ao grupo SHAM. Por sua vez, a TRH com CT não alterou a capacidade tamponante e o pH salivar em relação ao grupo SHAM, mas reverteu os demais parâmetros a níveis próximos ao do grupo SHAM.

A OQX aumentou o FS estimulado pela pilocarpina. Esse alcalóide parassimpaticomimético é um agonista colinérgico que estimula o receptor muscarínico 3 (M3), que induzem um aumento no nível de cálcio intracelular, causando principalmente a ativação dos canais luminais de cloreto (SUSA; SAWAI; AOKI; IIZUKA-KOGO *et al.*, 2013). O movimento contínuo do fluido salivar é possível devido às diferentes proteínas co-transportadoras de sódio, potássio e cloreto (MELVIN; YULE; SHUTTLEWORTH; BEGENISICH, 2005). Deste modo, a secreção salivar depende de um canal de cloreto na membrana apical das células acinares (ROMANENKO; CATALÁN; BROWN; PUTZIER *et al.*, 2010). Quando o cálcio intracelular aumenta durante a estimulação, o canal de cloreto se abre e o cloreto é liberado no lúmen acinar (GRESZ; KWON; HURLEY; VARGA *et al.*, 2001). A liberação de cloreto medeia o fluxo de sódio do interstício para o lúmen, o que, conseqüentemente, causa a transferência de água quase isosmolar através das aquaporina - 5 e/ou junções intercelulares (MATSUZAKI; SUSA; SHIMIZU; SAWAI *et al.*, 2012; SUSA; SAWAI; AOKI; IIZUKA-KOGO *et al.*, 2013). A saliva primária é rica em eletrólitos, que atraem água para o lúmen. Em uma etapa secundária, os eletrólitos são reabsorvidos através das células do ducto epitelial para reduzir sua concentração na saliva antes de serem liberados na cavidade oral (PORCHERI; MITSIDIS, 2019). Os ductos salivares têm função secretora mínima de fluidos, mas participam da reabsorção de íons, incluindo sódio

(DINUDDOM; HARVEY; KOMWATANA; YOUNG *et al.*, 1998), cálcio (BANDYOPADHYAY; SWAIM; SARKAR; LIU *et al.*, 2012) e fosfato (HOMANN; ROSINSTEINER; STRATMANN; ARNOLD *et al.*, 2005). A involução dos ductos da glândula PA e SM associadas ao aumento do cálcio, fosfato e cloreto salivar sugere que o maior FS no grupo OQX é causado por disfunções na troca de eletrólitos ao longo do sistema ductal.

Apesar do aumento do FS no grupo OQX, não foram encontradas alterações no pH salivar e capacidade tamponante. A capacidade tamponante é determinada pela atividade do ortofosfato inorgânico, ácido carbônico/bicarbonato e sistema proteico (LAMANDA; CHEAIB; TURGUT; LUSSI, 2007). A capacidade tamponante da saliva funciona de forma mais eficiente durante o FS estimulado, mas é quase ineficaz na saliva não-estimulada (EDGAR, 1990). Em contrapartida, durante o FS não-estimulado, o tampão fosfato é considerado o principal sistema tampão (LAGERLÖF; OLIVEBY, 1994). Nosso estudo mostrou que a redução da concentração de PT e o aumento de fosfato na saliva, provavelmente tiveram um efeito compensatório em relação ao pH e capacidade tamponante, mantendo os valores de pH e capacidade tamponante semelhantes aos dos grupos SHAM e CT, nos quais os valores de FS, PT e fosfato foram semelhantes entre si.

O modelo experimental *ex vivo* usando *slices* da glândula PA de ratos OQX, mostrou que a deficiência de T reduziu a liberação de AMI e a concentração de PT evocado por carbacol e anandamida, o que foi associado à regulação negativa dos receptores muscarínicos (BUSCH; BORDA, 2003b) e canabíoides (BUSCH; STERIN-BORDA; BORDA, 2006b), respectivamente. A TRH com T restaurou a atividade de AMI em ratos OQX (BUSCH; BORDA, 2003a). Embora em nossa pesquisa a coleta de saliva estimulada tenha sido induzida pela pilocarpina, um agente colinérgico parassimpaticomimético com ação muscarínica não-seletiva, mas com atividade β -adrenérgica leve, os dados sugerem que a liberação de AMI e a concentração de PT evocado pela pilocarpina também são reduzidos após a OQX, no entanto, esta pesquisa é a primeira a reproduzir essa evidência *in vivo*.

A OQX está associada ao aumento dos níveis de PC e TBARS no plasma sanguíneo (DEYHIM; PATIL; VILLARREAL; LOPEZ *et al.*, 2007), coração (REGOUAT; CHEBOUB; BENAHMED; BELARBI *et al.*, 2018), epitélio acinar da próstata ventral (TAM; GAO; LEUNG; HO, 2003) e no cérebro (WANG; LIU; ZHANG; CHEN *et al.*, 2019) de camundongos e ratos, semelhante ao perfil observado nas glândulas PA e SM. Contudo, a TRH com CT foi eficaz para reduzir esses parâmetros a níveis próximos ao grupo SHAM. Da mesma forma, a TRH com propionato de T protegeu as células granulares cerebelares (AHLBOM; PRINS; CECCATELLI, 2001) e a TRH com enantato

de T foi eficiente em proteger o coração (REGOUAT; CHEBOUB; BENAHMED; BELARBI *et al.*, 2018) do estresse oxidativo.

A OQX aumentou apenas a defesa antioxidante não-enzimática na glândula PA avaliado por meio da FRAP, AU e GSH; enquanto que na glândula SM houve incremento da defesa antioxidante enzimática (SOD, CAT e GPx) e não-enzimática, como mencionada anteriormente. A elevação da FRAP pode estar associado, pelo menos em parte, a maior concentração de AU e GSH nas glândulas PA e SM dos animais. Por sua vez, a concentração de AU presente nas glândulas salivares e no plasma pode aumentar em resposta ao estresse oxidativo (KOŁODZIEJ; MACIEJCZYK; MIĄSKO; MATCZUK *et al.*, 2017; ZALEWSKA; KNAŚ; MACIEJCZYK; WASZKIEWICZ *et al.*, 2015). A elevação da concentração de AU no rim de ratos OQX está relacionado a maior produção de radicais livres, o que leva a uma ação da defesa antioxidante na tentativa de contrabalançar o ambiente pró-oxidante. Já a resposta da glândula SM em elevar a defesa antioxidante enzimática e não-enzimática frente ao dano oxidativo, demonstra resposta defensiva, mas também uma tentativa de compensar a resposta antioxidante deficiente da glândula PA, visando proteger a cavidade bucal do aumento de radicais livres (KOŁODZIEJ; MACIEJCZYK; MIĄSKO; MATCZUK *et al.*, 2017; ZALEWSKA; KNAŚ; MACIEJCZYK; WASZKIEWICZ *et al.*, 2015).

A modulação do estado oxidativo induzido pela deficiência de T é tecido-específica. Por exemplo, a FRAP foi significativamente reduzida após a OQX no plasma (DEYHIM; PATIL; VILLARREAL; LOPEZ *et al.*, 2007) e no ventrículo esquerdo de ratos Wistar (SZABÓ; BÖRZSEI; KUPAI; HOFFMANN *et al.*, 2019). A OQX também diminuiu os níveis de GSH no coração de ratos (REGOUAT; CHEBOUB; BENAHMED; BELARBI *et al.*, 2018). Além disso, a OQX atenuou a atividade da SOD e CAT no rim de camundongos (CHO; JUNG; JANG; KIM *et al.*, 2012), além de diminuir a atividade da SOD, CAT e GPX no sangue e coração de ratos diabéticos (CHODARI; SMAILNEJAD; FALLAHI; KHALAJI *et al.*, 2019).

De fato, a TRH com CT foi eficaz na redução do dano oxidativo e no restabelecimento da capacidade antioxidante não-enzimática e enzimática a níveis próximos ao do grupo SHAM. Em outro estudo, a administração de propionato de T em ratos machos senescentes protegeu as células granulares cerebelares do estresse oxidativo, por meio de mecanismo mediado por receptores de androgênio que levaram ao aumento da atividade da CAT (AHLBOM; PRINS; CECCATELLI, 2001), enquanto que a administração de enantato de T protegeu o tecido cardíaco (REGOUAT; CHEBOUB; BENAHMED; BELARBI *et al.*, 2018); além disso, deve-se levar em consideração que as diferentes doses e tipos de T usados nesses estudos atingiram níveis fisiológicos de T. Embora tenhamos observado um aumento significativo da

próstata indicando que a dose foi suprafisiológica, não houve aumento do dano oxidativo nas glândulas salivares quatro semanas após o início da terapia. Esses resultados podem estar associados ao fato da excreção e/ou metabolismo dos esteróides serem diferentes nas glândulas salivares e a resposta adaptativa à dose de T utilizada como descrito na literatura (BÜTTLER; BAGCI; BRAND; HEIJER *et al.*, 2018).

Existem algumas limitações. O presente estudo explorou os efeitos da OQX e da TRH em animais adultos jovens. Essas intervenções podem não conferir o mesmo efeito fisiológico em ratos senis com hipogonadismo de início tardio. Portanto, pesquisas futuras são necessárias para validar esse efeito da T nas glândulas salivares de animais idosos. Outro ponto importante será analisar se os diferentes protocolos de TRH, utilizando diferentes preparações de T, terão os mesmos efeitos sobre a função das glândulas salivares.

6 CONCLUSÃO

A OQX modula o estresse oxidativo nas glândulas salivares e também afeta a secreção e a composição da saliva. Portanto, os resultados deste estudo mostram que, além de preservar a estrutura e função das glândulas salivares, a TRH protege as glândulas salivares e a saliva do estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ADTHAPANYAWANICH, K.; KUMCHANTUEK, T.; NAKATA, H.; YAMAMOTO, M. *et al.* Morphology and gene expression profile of the submandibular gland of androgen-receptor-deficient mice. **Arch Oral Biol**, 60, n. 2, p. 320-332, Feb 2015.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984.
- AHLBOM, E.; PRINS, G. S.; CECCATELLI, S. Testosterone protects cerebellar granule cells from oxidative stress-induced cell death through a receptor mediated mechanism. **Brain Res**, 892, n. 2, p. 255-262, Feb 2001.
- AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, 77, p. 373-382, 1981.
- AMANO, O.; MIZOBE, K.; BANDO, Y.; SAKIYAMA, K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. **Acta Histochem Cytochem**, 45, n. 5, p. 241-250, Oct 2012.
- ANVISA., A. D. V. S. **Hipogonadismo Masculino**. 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33884/412285/Boletim+Sa%C3%BAde+e+Economia+n%C2%BA+12/204c4a17-6400-46c9-ae73-95338059ac04>.
- ARMADA, L.; DE CASTRO BRASIL, S.; ARMADA-DIAS, L.; BEZERRA, J. *et al.* Effects of aging, gender, and hypogonadism on mandibular bone density. **J Investig Clin Dent**, 9, n. 2, p. e12310, May 2018.
- AXELL, A. M.; MACLEAN, H. E.; PLANT, D. R.; HARCOURT, L. J. *et al.* Continuous testosterone administration prevents skeletal muscle atrophy and enhances resistance to fatigue in orchidectomized male mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 291, n. 3, p. E506-516, Sep 2006.
- BAIN, J. Testosterone and the aging male: to treat or not to treat? **Maturitas**, 66, n. 1, p. 16-22, May 2010.
- BANDYOPADHYAY, B. C.; SWAIM, W. D.; SARKAR, A.; LIU, X. *et al.* Extracellular Ca(2+) sensing in salivary ductal cells. **J Biol Chem**, 287, n. 36, p. 30305-30316, Aug 2012.
- BENCHARIT, S.; ALTARAWNEH, S. K.; BAXTER, S. S.; CARLSON, J. *et al.* Elucidating role of salivary proteins in denture stomatitis using a proteomic approach. **Mol Biosyst**, 8, n. 12, p. 3216-3223, Oct 30 2012.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, 239, n. 1, p. 70-76, Jul 1996.
- BERTOLDO, B. B.; ETCHEBEHERE, R. M.; FURTADO, T. C. S.; FARIA, J. B. *et al.* Lingual salivary gland hypertrophy and decreased acinar density in chagasic patients without megaesophagus. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 61, p. e67, 2019.
- BHASIN, S.; BRITO, J. P.; CUNNINGHAM, G. R.; HAYES, F. J. *et al.* Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, 103, n. 5, p. 1715-1744, May 1 2018.

BI, Y.; PERRY, P. J.; ELLERBY, M.; MURRY, D. J. Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Depot Testosterone Cypionate in Healthy Male Subjects. **CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol**, 7, n. 4, p. 259-268, Apr 2018.

BOBJER, J.; KATRINAKI, M.; TSATSANIS, C.; LUNDBERG GIWERCMAN, Y. *et al.* Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study. **PLoS One**, 8, n. 4, p. e61466, 2013.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-310, 1978.

BUSCH, L.; BORDA, E. Castration decreases amylase release associated with muscarinic acetylcholine receptor downregulation in rat parotid gland. **British Journal of Pharmacology**, 139, n. 2, p. 399-407, May 2003a. Article.

BUSCH, L.; BORDA, E. Castration decreases amylase release associated with muscarinic acetylcholine receptor downregulation in rat parotid gland. **Br J Pharmacol**, 139, n. 2, p. 399-407, May 2003b.

BUSCH, L.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands. **Arch Oral Biol**, 47, n. 10, p. 717-722, Oct 2002.

BUSCH, L.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. An overview of autonomic regulation of parotid gland activity: influence of orchietomy. **Cells Tissues Organs**, 182, n. 3-4, p. 117-128, 2006a.

BUSCH, L.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. Effects of castration on cannabinoid cb receptor expression and on the biological actions of cannabinoid in the parotid gland. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 33, n. 3, p. 258-263, Mar 2006b.

BÜTTLER, R. M.; BAGCI, E.; BRAND, H. S.; HEIJER, M. D. *et al.* Testosterone, androstenedione, cortisol and cortisone levels in human unstimulated, stimulated and parotid saliva. **Steroids**, 138, p. 26-34, 10 2018.

CAKMAK KARAER, I.; SIMSEK, G.; YILDIZ, A.; VARDI, N. *et al.* Melatonin's protective effect on the salivary gland against ionized radiation damage in rats. **J Oral Pathol Med**, 45, n. 6, p. 444-449, Jul 2016.

CHEN, G.; ZOU, Y.; ZHANG, X.; XU, L. *et al.* beta-Actin protein expression differs in the submandibular glands of male and female mice. **Cell Biol Int**, 40, n. 7, p. 779-786, Jul 2016.

CHO, M. H.; JUNG, K. J.; JANG, H. S.; KIM, J. I. *et al.* Orchietomy attenuates kidney fibrosis after ureteral obstruction by reduction of oxidative stress in mice. **Am J Nephrol**, 35, n. 1, p. 7-16, 2012.

CHODARI, L.; SMAILNEJAD, S.; FALLAHI, M.; KHALAJI, N. *et al.* OXIDATIVE STRESS IS MARKEDLY REDUCED BY COMBINED VOLUNTARY EXERCISE AND TESTOSTERONE IN THE HEART OF DIABETIC RATS. **Acta Endocrinol (Buchar)**, 15, n. 2, p. 173-181, 2019 Apr-Jun 2019.

CHRÉTIEN, M. Action of testosterone on the differentiation and secretory activity of a target organ: the submaxillary gland of the mouse. **Int Rev Cytol**, 50, p. 333-396, 1977.

CONTINI, M. D.; MILLEN, N.; GONZÁLEZ, M.; BENMELEJ, A. *et al.* Orchiectomy attenuates oxidative stress induced by aluminum in rats. **Toxicol Ind Health**, 32, n. 8, p. 1515-1526, Aug 2016.

DALTABAN, O.; SAYGUN, I.; BOLU, E. Periodontal status in men with hypergonadotropic hypogonadism: effects of testosterone deficiency. **J Periodontol**, 77, n. 7, p. 1179-1183, Jul 2006.

DE OLIVEIRA, D.; DE OLIVEIRA PUTTINI, I.; SILVA GOMES-FERREIRA, P. H.; PALIN, L. P. *et al.* Effect of intermittent teriparatide (PTH 1-34) on the alveolar healing process in orchiectomized rats. **Clin Oral Investig**, 23, n. 5, p. 2313-2322, May 2019.

DE PAIVA GONCALVES, V.; ORTEGA, A. A. C.; STEFFENS, J. P.; SPOLIDORIO, D. M. P. *et al.* Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model. **J Periodontol**, 89, n. 4, p. 466-475, Apr 2018.

DEYHIM, F.; PATIL, B. S.; VILLARREAL, A.; LOPEZ, E. *et al.* Cranberry juice increases antioxidant status without affecting cholesterol homeostasis in orchidectomized rats. **J Med Food**, 10, n. 1, p. 49-53, Mar 2007.

DINUDDOM, A.; HARVEY, K. F.; KOMWATANA, P.; YOUNG, J. A. *et al.* Nedd4 mediates control of an epithelial Na⁺ channel in salivary duct cells by cytosolic Na⁺. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 12, p. 7169-7173, Jun 1998.

DUDEK, P.; KOZAKOWSKI, J.; ZGLICZYNSKI, W. Late-onset hypogonadism. **Prz Menopauzalny**, 16, n. 2, p. 66-69, Jun 2017.

EDGAR, W. M. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. **Br Dent J**, 169, n. 3-4, p. 96-98, 1990 Aug 11-25 1990.

EKUNI, D.; ENDO, Y.; IRIE, K.; AZUMA, T. *et al.* Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. **Arch Oral Biol**, 55, n. 2, p. 170-176, Feb 2010.

ELIAS, G. P.; DOS SANTOS, O. A.; SASSAKI, K. T.; DELBEM, A. C. *et al.* Dental mineralization and salivary activity are reduced in offspring of spontaneously hypertensive rats (SHR). **J Appl Oral Sci**, 14, n. 4, p. 253-259, Aug 2006.

FAMILI, P.; CAULEY, J. A.; GREENSPAN, S. L. The effect of androgen deprivation therapy on periodontal disease in men with prostate cancer. **J Urol**, 177, n. 3, p. 921-924, Mar 2007.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of Tribulus terrestris and its role in the management of male erectile dysfunction--an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, 15, n. 1-2, p. 44-54, Jan 2008.

GRESZ, V.; KWON, T. H.; HURLEY, P. T.; VARGA, G. *et al.* Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 281, n. 1, p. G247-254, Jul 2001.

HAK, A. E.; WITTEMAN, J. C.; DE JONG, F. H.; GEERLINGS, M. I. *et al.* Low levels of endogenous androgens increase the risk of atherosclerosis in elderly men: the Rotterdam study. **J Clin Endocrinol Metab**, 87, n. 8, p. 3632-3639, Aug 2002.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, 35, n. Pt 5, p. 1147-1150, Nov 2007.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, 48, n. 2, p. 422-427, Aug 1972.

HOHL, A.; MARQUES, M. O.; CORAL, M. H.; WALZ, R. Evaluation of late-onset hypogonadism (andropause) treatment using three different formulations of injectable testosterone. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 53, n. 8, p. 989-995, Nov 2009.

HOMANN, V.; ROSIN-STEINER, S.; STRATMANN, T.; ARNOLD, W. H. *et al.* Sodium-phosphate cotransporter in human salivary glands: molecular evidence for the involvement of NPT2b in acinar phosphate secretion and ductal phosphate reabsorption. **Arch Oral Biol**, 50, n. 9, p. 759-768, Sep 2005.

HUHTANIEMI, I. Late-onset hypogonadism: current concepts and controversies of pathogenesis, diagnosis and treatment. **Asian J Androl**, 16, n. 2, p. 192-202, 2014 Mar-Apr 2014.

HUHTANIEMI, I. T. Andropause--lessons from the European Male Ageing Study. **Ann Endocrinol (Paris)**, 75, n. 2, p. 128-131, May 2014.

HULLY, J. R.; BENTON, H. P.; ALISON, M. R. Isoprenaline-induced cell proliferation in mouse salivary glands: the effect of castration. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, 47, n. 2, p. 95-105, 1984.

ILEA, A.; ANDREI, V.; FEURDEAN, C. N.; BABTAN, A. M. *et al.* Saliva, a Magic Biofluid Available for Multilevel Assessment and a Mirror of General Health-A Systematic Review. **Biosensors (Basel)**, 9, n. 1, Feb 14 2019.

JENA, A. K.; VASISHT, K.; SHARMA, N.; KAUR, R. *et al.* Amelioration of testosterone induced benign prostatic hyperplasia by Prunus species. **J Ethnopharmacol**, 190, p. 33-45, Aug 22 2016.

JEZEK, D.; BANEK, L.; BANEK, T. Effects of orchiectomy on the rat parotid gland--an ultrastructural and stereological study. **Acta Anat (Basel)**, 155, n. 3, p. 172-183, 1996.

KARAKIDA, L. M.; ARAUJO, C. M.; JOHANN, A.; CAMARGO, E. S. *et al.* Interaction of Anabolic Androgenic Steroids and Induced Tooth Movement in Rats. **Braz Dent J**, 28, n. 4, p. 504-510, Jul-Aug 2017.

KATAOKA, T.; HOTTA, Y.; MAEDA, Y.; KIMURA, K. Testosterone Deficiency Causes Endothelial Dysfunction via Elevation of Asymmetric Dimethylarginine and Oxidative Stress in Castrated Rats. **J Sex Med**, 14, n. 12, p. 1540-1548, Dec 2017.

KONDO, Y.; NAKAMOTO, T.; JARAMILLO, Y.; CHOI, S. *et al.* Functional differences in the acinar cells of the murine major salivary glands. **J Dent Res**, 94, n. 5, p. 715-721, May 2015.

KOŁODZIEJ, U.; MACIEJCZYK, M.; MIĄSKO, A.; MATCZUK, J. *et al.* Oxidative Modification in the Salivary Glands of High Fat-Diet Induced Insulin Resistant Rats. **Front Physiol**, 8, p. 20, 2017.

KUMAR, V.; YADAV, C. S.; DATTA, S. K.; SINGH, S. *et al.* Association of GSTM1 and

GSTT1 polymorphism with lipid peroxidation in benign prostate hyperplasia and prostate cancer: a pilot study. **Dis Markers**, 30, n. 4, p. 163-169, 2011.

LAAKSONEN, D. E.; NISKANEN, L.; PUNNONEN, K.; NYSSONEN, K. *et al.* Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. **Diabetes Care**, 27, n. 5, p. 1036-1041, May 2004.

LAGERLÖF, F.; OLIVEBY, A. Caries-protective factors in saliva. **Adv Dent Res**, 8, n. 2, p. 229-238, Jul 1994.

LAMANDA, A.; CHEAIB, Z.; TURGUT, M. D.; LUSSI, A. Protein buffering in model systems and in whole human saliva. **PLoS One**, 2, n. 2, p. e263, Feb 2007.

LAUGHLIN, G. A.; BARRETT-CONNOR, E.; BERGSTROM, J. Low serum testosterone and mortality in older men. **J Clin Endocrinol Metab**, 93, n. 1, p. 68-75, Jan 2008.

LI, H. J.; YAO, B.; LIANG, W.; WANG, Y. M. *et al.* Localization and potential function of androgen receptor in rat salivary gland. **Asian J Androl**, 7, n. 3, p. 295-301, Sep 2005.

LOOD, Y.; AARDAL-ERIKSSON, E.; WEBE, C.; AHLNER, J. *et al.* Relationship between testosterone in serum, saliva and urine during treatment with intramuscular testosterone undecanoate in gender dysphoria and male hypogonadism. **Andrology**, 6, n. 1, p. 86-93, Jan 2018.

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**, 47, n. 3, p. 469-474, Sep 16 1974.

MARUYAMA, C. L.; MONROE, M. M.; HUNT, J. P.; BUCHMANN, L. *et al.* Comparing human and mouse salivary glands: A practice guide for salivary researchers. **Oral Dis**, 25, n. 2, p. 403-415, Mar 2019.

MATSUZAKI, T.; SUSAKI, T.; SHIMIZU, K.; SAWAI, N. *et al.* Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. **Acta Histochem Cytochem**, 45, n. 5, p. 251-259, Oct 2012.

MELLSTROM, D.; JOHNNELL, O.; LJUNGGREN, O.; ERIKSSON, A. L. *et al.* Free testosterone is an independent predictor of BMD and prevalent fractures in elderly men: MrOS Sweden. **J Bone Miner Res**, 21, n. 4, p. 529-535, Apr 2006.

MELVIN, J. E.; HAMILL, R. W. Altered sympathetic-salivary gland development: delayed response to postnatal castration. **J Dent Res**, 66, n. 3, p. 751-755, Mar 1987.

MELVIN, J. E.; YULE, D.; SHUTTLEWORTH, T.; BEGENISICH, T. Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. **Annu Rev Physiol**, 67, p. 445-469, 2005.

MESQUITA, C. S.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D. *et al.* Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Anal Biochem**, 458, p. 69-71, Aug 2014.

MINETTI, C. A.; VALLE, L. B.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; FAVA-DE-MORAES, F. Differential actions of testosterone and its metabolites on mice submandibular gland. **J Biol Buccale**, 13, n. 3, p. 205-213, Sep 1985.

MIRONE, V.; DEBRUYNE, F.; DOHLE, G.; SALONIA, A. *et al.* European Association of Urology Position Statement on the Role of the Urologist in the Management of Male Hypogonadism and Testosterone Therapy. **Eur Urol**, 72, n. 2, p. 164-167, Aug 2017.

MONTEIRO, M. M.; D'EPIRO, T. T.; BERNARDI, L.; FOSSATI, A. C. *et al.* Long- and short-term diabetes mellitus type 1 modify young and elder rat salivary glands morphology. **Arch Oral Biol**, 73, p. 40-47, Jan 2017.

NAGY, A.; BARTA, A.; VARGA, G.; ZELLES, T. Changes of salivary amylase in serum and parotid gland during pharmacological and physiological stimulation. **J Physiol Paris**, 95, n. 1-6, p. 141-145, Jan-Dec 2001.

NARDOZZA JUNIOR, A.; SZELBRACIKOWSKI SDOS, S.; NARDI, A. C.; ALMEIDA, J. C. Age-related testosterone decline in a Brazilian cohort of healthy military men. **Int Braz J Urol**, 37, n. 5, p. 591-597, Sep-Oct 2011.

NIESCHLAG, E. Testosterone treatment comes of age: new options for hypogonadal men. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 65, n. 3, p. 275-281, Sep 2006.

NIKOLAENKO, L.; JIA, Y.; WANG, C.; DIAZ-ARJONILLA, M. *et al.* Testosterone replacement ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in castrated male rats. **Endocrinology**, 155, n. 2, p. 417-428, Feb 2014.

NUNES, L. A.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **Biochem Med (Zagreb)**, 25, n. 2, p. 177-192, 2015.

ONO MINAGI, H.; SARPER, S. E.; KUROSAKA, H.; KUREMOTO, K. I. *et al.* Runx1 mediates the development of the granular convoluted tubules in the submandibular glands. **PLoS One**, 12, n. 9, p. e0184395, 2017.

PEDERSEN, A. M. L.; SORENSEN, C. E.; PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. *et al.* Salivary secretion in health and disease. **J Oral Rehabil**, 45, n. 9, p. 730-746, Sep 2018.

PICCO, D. C.; COSTA, L. F.; DELBEM, A. C.; SASSAKI, K. T. *et al.* Spontaneously hypertensive rat as experimental model of salivary hypofunction. **Arch Oral Biol**, 57, n. 10, p. 1320-1326, Oct 2012.

PORCHERI, C.; MITSIDIS, T. A. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. **Cells**, 8, n. 9, 08 2019.

REGOUAT, N.; CHEBOUB, A.; BENAHMED, M.; BELARBI, A. *et al.* Effect of testosterone supplementation on nitroso-redox imbalance, cardiac metabolism markers, and S100 proteins expression in the heart of castrated male rats. **Andrology**, 6, n. 1, p. 74-85, Jan 2018.

RENEE R. HUKKANEN, S. M. D., PIPER M. TREUTING,. Salivary glands. 135-145 p. 2018.

REZAEI, N.; AZADI, A.; PAKZAD, R. Prevalence of andropause among Iranian men and its relationship with quality of life. **Aging Male**, p. 1-8, Aug 7 2018.

RINS DE DAVID, M. L.; FINKELBERG DE STERIN, A.; GOLDRAIJ, A. Influence of gonadic hormones on the rat submaxillary gland. **Arch Int Physiol Biochim Biophys**, 99, n. 1, p. 107-109, Feb 1991.

ROMANENKO, V. G.; CATALÁN, M. A.; BROWN, D. A.; PUTZIER, I. *et al.* Tmem16A encodes the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. **J Biol Chem**, 285, n. 17, p. 12990-13001, Apr 2010.

RUHL, S. The scientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. **Expert Rev Proteomics**, 9, n. 1, p. 85-96, 2012.

SAKR, H. F.; HUSSEIN, A. M.; EID, E. A.; ALKHATEEB, M. Possible mechanisms underlying fatty liver in a rat model of male hypogonadism: A protective role for testosterone. **Steroids**, 135, p. 21-30, Jul 2018.

SALERNO, M.; CASCIO, O.; BERTOZZI, G.; SESSA, F. *et al.* Anabolic androgenic steroids and carcinogenicity focusing on Leydig cell: a literature review. **Oncotarget**, 9, n. 27, p. 19415-19426, Apr 10 2018.

SAWADA, K.; NOUMURA, T. Effects of castration and sex steroids on sexually dimorphic development of the mouse submandibular gland. **Acta Anat (Basel)**, 140, n. 2, p. 97-103, 1991.

SHIN, Y. S.; PARK, J. K. The Optimal Indication for Testosterone Replacement Therapy in Late Onset Hypogonadism. **J Clin Med**, 8, n. 2, Feb 2019.

SHOIEB, S. M.; ESMAT, A.; KHALIFA, A. E.; ABDEL-NAIM, A. B. Chrysin attenuates testosterone-induced benign prostate hyperplasia in rats. **Food Chem Toxicol**, 111, p. 650-659, Jan 2018.

SNYDER, P. J.; BHASIN, S.; CUNNINGHAM, G. R.; MATSUMOTO, A. M. *et al.* Effects of Testosterone Treatment in Older Men. **N Engl J Med**, 374, n. 7, p. 611-624, Feb 18 2016.

SON, S. W.; LEE, J. S.; KIM, H. G.; KIM, D. W. *et al.* Testosterone depletion increases the susceptibility of brain tissue to oxidative damage in a restraint stress mouse model. **J Neurochem**, 136, n. 1, p. 106-117, Jan 2016.

STEFFENS, J. P.; WANG, X.; STARR, J. R.; SPOLIDORIO, L. C. *et al.* Associations Between Sex Hormone Levels and Periodontitis in Men: Results From NHANES III. **J Periodontol**, 86, n. 10, p. 1116-1125, Oct 2015.

STELLATO, R. K.; FELDMAN, H. A.; HAMDY, O.; HORTON, E. S. *et al.* Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. **Diabetes Care**, 23, n. 4, p. 490-494, Apr 2000.

SUSA, T.; SAWAI, N.; AOKI, T.; IIZUKA-KOGO, A. *et al.* Effects of repeated administration of pilocarpine and isoproterenol on aquaporin-5 expression in rat salivary glands. **Acta Histochem Cytochem**, 46, n. 6, p. 187-197, Dec 2013.

SZABÓ, R.; BÖRZSEI, D.; KUPAI, K.; HOFFMANN, A. *et al.* Spotlight on a New Heme Oxygenase Pathway: Testosterone-Induced Shifts in Cardiac Oxidant/Antioxidant Status. **Antioxidants (Basel)**, 8, n. 8, Aug 2019.

TAM, N. N.; GAO, Y.; LEUNG, Y. K.; HO, S. M. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. **Am J Pathol**, 163, n. 6, p. 2513-2522, Dec 2003.

TARTAGLIA, G. M.; GAGLIANO, N.; ZARBIN, L.; TOLOMEO, G. *et al.* Antioxidant capacity of human saliva and periodontal screening assessment in healthy adults. **Arch Oral Biol**, 78, p. 34-38, Jun 2017.

TAYLOR, M. K.; PADILLA, G. A.; HERNANDEZ, L. M. Anabolic hormone profiles in elite military men: Robust associations with age, stress, and fatigue. **Steroids**, 124, p. 18-22, Aug 2017.

TEK, M.; BALLI, E.; CIMEN, B.; EFESYOY, O. *et al.* The effect of testosterone replacement therapy on bladder functions and histology in orchiectomized mature male rats. **Urology**, 75, n. 4, p. 886-890, Apr 2010.

THOENEN, H.; ANGELETTI, P. U.; LEVI-MONTALCINI, R.; KETTLER, R. Selective induction by nerve growth factor of tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase in the rat superior cervical ganglia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 68, n. 7, p. 1598-1602, Jul 1971.

TRIVEDI, R. C.; REBAR, L.; BERTA, E.; STONG, L. New enzymatic method for serum uric acid at 500 nm. **Clin Chem**, 24, n. 11, p. 1908-1911, Nov 1978.

UBELS, J. L.; VEENSTRA, E.; DITLEV, J.; INGERSOLL, K. Interactions of testosterone and all-trans retinoic acid in regulation of androgen receptor expression in rat lacrimal gland. **Exp Eye Res**, 77, n. 6, p. 741-748, Dec 2003.

WALLEN, W. J.; BELANGER, M. P.; WITTNICH, C. Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. **J Nutr**, 132, n. 8, p. 2246-2250, Aug 2002.

WANG, J. T.; LIU, Z. Q.; ZHANG, T. Y.; CHEN, Y. *et al.* [Screening of periodontal and salivary parameters in patients with frequent acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease]. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, 54, n. 6, p. 410-415, Jun 2019.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, 77, p. 325-333, 1981.

WHELAN, K. F.; LU, J. P.; FRIDMAN, E.; WOLF, A. *et al.* What can surrogate tissues tell us about the oxidative stress status of the prostate? A hypothesis-generating in-vivo study. **PLoS One**, 5, n. 12, p. e15880, Dec 28 2010.

WU, X.; GU, Y.; LI, L. The anti-hyperplasia, anti-oxidative and anti-inflammatory properties of Qing Ye Dan and swertiamarin in testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in rats. **Toxicol Lett**, 265, p. 9-16, Jan 4 2017.

YAMAMOTO, M.; NAKATA, H.; KUMCHANTUEK, T.; ADHAPANYAWANICH, K. *et al.* Distinct hormonal regulation of two types of sexual dimorphism in submandibular gland of mice. **Cell Tissue Res**, 371, n. 2, p. 261-272, Feb 2018.

YEAP, B. B.; WU, F. C. W. Clinical practice update on testosterone therapy for male hypogonadism: Contrasting perspectives to optimize care. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 90, n. 1, p. 56-65, 01 2019.

ZALEWSKA, A.; KNAŚ, M.; MACIEJCZYK, M.; WASZKIEWICZ, N. *et al.* Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation markers in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. **Arch Oral Biol**, 60, n. 9, p.

1375-1386, Sep 2015.

ZUKOWSKI, P.; MACIEJCZYK, M.; MATCZUK, J.; KUREK, K. *et al.* Effect of N-Acetylcysteine on Antioxidant Defense, Oxidative Modification, and Salivary Gland Function in a Rat Model of Insulin Resistance. **Oxid Med Cell Longev**, 2018, p. 6581970, 2018.

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos da orquiectomia e o impacto de andrógenos nas glândulas salivares de ratos Wistar: implicações nos parâmetros bioquímicos salivares, estado oxidativo, sinalização das MAPKs, remodelamento glandular e aspectos histopatológicos"**, Processo FOA nº 00956-2018, sob responsabilidade de Antonio Hernandes Chaves Neto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Fevereiro de 2019.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Março de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Abril de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effects of orchiectomy and the impact of androgens on the salivary glands of Wistar rats: implications on salivary biochemical parameters, oxidative status, MAPK signaling, glandular remodeling and histopathological aspects"**, Protocol FOA nº 00956-2018, under the supervision of Antonio Hernandes Chaves Neto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 15, 2019.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 01, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 01, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
 Coordenador da CEUA
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
 Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
 Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br